AJOUT D'UN CONTRÔLE D'INHIBITION DANS DES KITS STR MULTIPLEX

Laboratoire AURIGEN, Lausanne,
Novembre 2008-Avril 2009

Travail réalisé par Miriam Iglesias sous la supervision du Dr Raphaël Coquoz.

1 Sommaire

Il arrive qu'après une Polymerase Chain Reaction (PCR), aucun profil ne soit obtenu sur l'analyseur de fragment. Comment savoir s'il s'agit d'inhibition ou s'il n'y a simplement pas d'ADN dans l'extrait de l'échantillon, sans devoir au préalable quantifier l'ADN ? Pour répondre à cette question, il suffit de mettre au point un contrôle d'inhibition à partir d'un ADN animal ou végétal qui s'amplifie en même temps que l'extrait. Au sein du laboratoire Aurigen, ce besoin d'un contrôle d'inhibition (CI) est particulièrement ressenti pour des analyses de génétique forensique. Pour effectuer ces analyses, nous utilisons les kits suivants: PowerPlex® 16 System de Promega, AmpFlSTR® SGM Plus™, AmpFlSTR® MiniFiler™ et AmpFlSTR® Yfiler™ d'Applied Biosystems.

Après réflexion, nous avons opté pour l'ADN de souris. Il est facile d'accès et il est déjà utilisé dans d'autres techniques au laboratoire. Après de nombreux tests, les résultats obtenus sont très satisfaisants. Selon différents tests effectués :

- Le contrôle d'inhibition n'interfère pas dans le fonctionnement des kits.
- Il n'apparaît pas sur le profil lorsqu'il y a une substance inhibitrice dans la PCR.
- Même lorsque l'ADN ciblé par le kit est à la limite de détection, le contrôle d'inhibition est la première cible à être affectée par la quantité d'inhibiteur la plus faible ayant encore un effet.
- Il est reproductible.
- Il permet de déterminer si nous sommes en présence d'ADN dégradé ou s'il y a de l'inhibition.
- Pour terminer, le contrôle d'inhibition a été testé dans des cas réels et il réagit comme nous le souhaitons.

Les mots-clés sont soulignés.

2 Abstract

It happens that after a Polymerase Chain Reaction (PCR), no profile is obtained on the fragment analyzer. How can we know if it is the result of PCR inhibitors or if there is simply no DNA in the extract of the sample, without having to quantify the DNA beforehand? To answer this question, it is enough to work out a control of inhibition from an animal or plant DNA which gets amplified in the same tube as the target sequences from extract. Within the laboratory Aurigen, this need of a control of inhibition (CI) is particularly felt for analyses of forensic genetics. To make these analyses, we use the following kits: PowerPlex® 16 System from Promega, AmpFlSTR® SGM Plus™, AmpFlSTR® MiniFilerT™ and AmpFlSTR® Yfiler™ from Applied Biosystems.

After reflection, we opted for the mouse's DNA. It is easy of access and it is already used in other techniques in the laboratory. After numerous tests, results are very satisfactory. According to various performed tests :

- The control of inhibition does not interfere with the performance of the kits.
- It does not appear on the profile when there is an inhibitory substance in the PCR.
- Even when the DNA targeted by the kit is at the lower limit of detection, the control of inhibition is the first target to be affected by the weakest quantity of inhibitor still having an effect.
- It is reproducible.
- It helps to differentiate between a partial profile caused by DNA degradation and a partial profile caused by PCR inhibition.
- At the end, the control of inhibition was tested in real cases and it reacts as expected.

The keywords are underlined

3 Table des matières

1 Sommaire ..... - 1 -
2 Abstract ..... - 2 -
3 Table des matières ..... - 3 -
4 Introduction ..... - 5 -
4.1 L'Acide DésoxyriboNucléique ..... - 5 -
4.2 La Polymerase Chain Reaction (PCR) ..... - 6 -
4.2.1 But et principe de la PCR : ..... - 7 -
4.2.1.1 La dénaturation : ..... - 7 -
4.2.1.2 L'hybridation : ..... - 7 -
4.2.1.3 L'élongation ou l'extension : ..... - 7 -
4.2.1.4 La détection : ..... - 8 -
4.2.2 Applications de la PCR : ..... - 9 -
4.2.3 Avantages et inconvénients de la PCR : ..... - 11 -
5 But ..... - 12 -
6 Développement ..... - 12 -
6.1 Matériel ..... - 12 -
6.1.1 Les kits ..... - 12 -
6.1.1.1 Domaine d'application et principe des kits : ..... - 12 -
6.1.1.2 Kit PowerPlex® 16 System ..... - 14 -
6.1.1.3 Kit AmpFlSTR® SGM Plus™ ..... - 16 -
6.1.1.4 Kit AmpFlSTR® MiniFiler™ ..... - 18 -
6.1.1.5 Kit AmpFlSTR® Yfiler™ ..... - 20 -
6.1.2 Thermocycleur T3000 ou autre: ..... - 22 -
6.1.3 ABI Genetic Analyser 3130 : ..... - 22 -
6.1.4 Autre matériel nécessaire ..... - 24 -
6.1.5 Matériel biologique ..... - 25 -
6.1.5.1 Le contrôle d'inhibition (CI) ..... - 25 -
6.1.5.2 Extraits divers ..... - 26 -
6.2 Schéma général de la stratégie choisie ..... - 27 -
6.3 Essais réalisés ..... - 28 -
6.3.1 Premier essai: *amplification et choix de la concentration optimale de l'ADN de souris* ..... - 28 -
6.3.1.1 But ..... - 28 -
6.3.1.2 Méthode ..... - 28 -
6.3.1.3 Résultats ..... - 29 -
6.3.1.4 Analyse des résultats ..... - 30 -
6.3.2 Deuxième essai: *diminution des pics supplémentaires et insertion du contrôle d'inhibition dans un kit avec un ADN connu* ..... - 31 -
6.3.2.1 But ..... - 31 -
6.3.2.2 Méthode ..... - 31 -
6.3.2.3 Résultats ..... - 32 -
6.3.2.4 Analyse des résultats ..... - 33 -
6.3.3 Troisième essai: *utilisation d'un mélange prêt à l'emploi d'ADN de souris et des amorces correspondantes, et recherche de la concentration optimale*. ..... - 34 -
6.3.3.1 But ..... - 34 -
6.3.3.2 Méthode ..... - 34 -
6.3.3.3 Résultats ..... - 35 -

6.3.3.4 Analyse des résultats ..... - 35 -
6.3.4 Quatrième essai : *Essai du mélange prêt à l'emploi CIMIX avec différents kits* ..... - 36 -
6.3.4.1 But ..... - 36 -
6.3.4.2 Méthode ..... - 36 -
6.3.4.3 Résultats ..... - 37 -
6.3.4.4 Analyse des résultats ..... - 38 -
6.3.5 Cinquième essai: *inhibition de la Taq Polymérase dans les différents kits avec de l'hémoglobine* ..... - 39 -
6.3.5.1 But ..... - 39 -
6.3.5.2 Méthode ..... - 39 -
6.3.5.3 Résultats kit PowerPlex® 16 System ..... - 40 -
6.3.5.4 Analyse des résultats ..... - 41 -
6.3.5.5 Résultats kit AmpFlSTR® SGM Plus™ ..... - 41 -
6.3.5.6 Analyse des résultats ..... - 42 -
6.3.5.7 Résultats kit AmpFlSTR® MiniFiler™ ..... - 43 -
6.3.5.8 Analyse des résultats ..... - 44 -
6.3.5.9 Résultats kit AmpFlSTR® YFiler™ ..... - 45 -
6.3.5.10 Analyse des résultats ..... - 46 -
6.3.6 Sixième essai: *amplification d'une faible concentration d'ADN avec une faible inhibition de la Taq Polymérase dans le kit PowerPlex® 16 System.* ..... - 47 -
6.3.6.1 But ..... - 47 -
6.3.6.2 Méthode ..... - 47 -
6.3.6.3 Résultats ..... - 47 -
6.3.6.4 Analyses des résultats ..... - 48 -
6.3.7 Septième essai: *reproductibilité du contrôle d'inhibition.* ..... - 49 -
6.3.7.1 But ..... - 49 -
6.3.7.2 Méthode ..... - 49 -
6.3.7.3 Résultats ..... - 49 -
6.3.7.4 Analyse des résultats ..... - 51 -
6.3.8 Huitième essai : *utilisation du CI dans l'amplification d'extraits de matériel fixé.* ..... - 52 -
6.3.8.1 But ..... - 52 -
6.3.8.2 Méthode ..... - 52 -
6.3.8.3 Résultats ..... - 52 -
6.3.8.4 Analyse des résultats ..... - 54 -
6.3.9 Neuvième essai : *insertion du CI dans l'amplification d'extraits de cas réels d'analyse forensique.* ..... - 55 -
6.3.9.1 But ..... - 55 -
6.3.9.2 Méthode ..... - 55 -
6.3.9.3 Résultats ..... - 55 -
6.3.9.4 Analyse des résultats ..... - 57 -
7 Conclusion générale ..... - 58 -
8 Conclusion personnelle ..... - 59 -
9 Remerciements ..... - 60 -
10 Bibliographie ..... - 61 -
11 Lexique ..... - 63 -
12 Annexes ..... - 65 -

4 Introduction

Les domaines d'application du laboratoire dans lequel j'effectue mon travail de diplôme, sont les suivants: l'histologie, la cytologie, la cytogénétique, la génétique médicale et pour terminer la génétique forensique.

En génétique médicale et forensique, la plupart des résultats du diagnostic repose sur une technique bien connue actuellement la PCR. De nombreuses applications de cette technique sont actuellement commercialisées sous la forme de kits.

Tout d'abord, nous expliquerons brièvement l'ADN. Ensuite, nous allons expliquer la PCR, son fonctionnement et ses applications. Et enfin, nous terminerons par définir les avantages et les désavantages de la PCR ce qui nous amènera au sujet de mon travail de diplôme.

4.1 L'Acide DésoxyriboNucléique

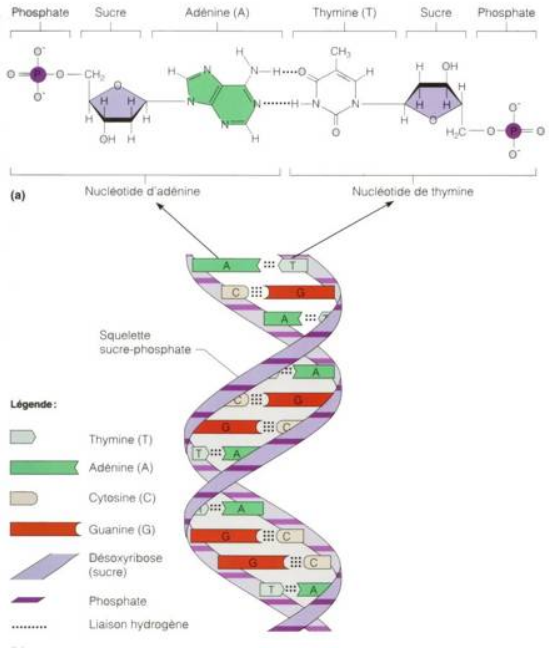


Figure [1]: Structure de l'ADN

Tous les êtres vivants ont pour support l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN). Présent au sein des cellules, l'ADN se compose d'une succession de quatre éléments différents appelés nucléotides. Chaque nucléotide est formé par l'association d'un sucre, d'un acide et d'une base dont il existe quatre variantes : l'adénine (A), la thymine (T), la guanine (G) et la cytosine (C). L'ordre dans lequel se succèdent ces quatre bases tout au long de la molécule d'ADN constitue l'information génétique, propre à chaque être vivant [Wautier, p.2].

La structure de l'ADN en un double brin hélicoïdal est causée par l'appariement des bases AT (deux ponts hydrogène) et CG (trois ponts hydrogène). Il est important de signaler que les deux brins d'ADN sont toujours liés entre eux dans une position antiparallèle [Jaunin, p.5].

4.2 La Polymerase Chain Reaction (PCR)

La PCR fut décrite pour la première fois par Kary Mullis en 1985 [Saiki]. Son principe repose sur l'utilisation de l'ADN polymérase (par exemple : la Taq polymérase). Il s'agit en fait d'une réplication in vitro de séquences spécifiques d'ADN. Cette méthode permet de produire une très grande quantité d'ADN cible à partir d'un extrait d'ADN (ADN matriciel).

L'ADN extrait à partir d'un organisme ou un échantillon contenant des ADN d'origines diverses n'est pas directement analysable. En effet, si nous nous intéressons à une séquence cible précise, celle-ci n'est pas visible au milieu des milliers d'autres séquences ADN de l'extrait lorsque nous utilisons une technique simple comme une électrophorèse. À partir d'une telle masse, la PCR peut sélectionner grâce à des amorces, une ou plusieurs séquences déterminées, qu'il s'agisse de la séquence d'un gène ou de séquences non codantes et les amplifier par réplication à des dizaines de milliards de copies. La réaction terminée, la quantité extrêmement faible d'ADN matriciel contenue dans l'échantillon PCR n'aura pas varié. En revanche, la quantité de la ou des séquences amplifiées (l'ADN cible) sera très grande [Jaunin, p.73].

Les applications de la PCR sont multiples. C'est une technique désormais incontournable en biologie cellulaire et moléculaire. Elle est largement utilisée à des fins de diagnostic pour détecter la présence d'une séquence d'ADN spécifique de tel ou tel organisme dans un fluide biologique ou pour détecter des mutations génomiques ou chromosomiques, comme la mucoviscidose ou une trisomie lors d'un dépistage prénatal par exemple. Elle est aussi employée pour réaliser des profils génétiques, qu'il s'agisse de l'identification génétique d'une personne dans le cadre d'une enquête judiciaire, de paternité ou de l'identification de variétés animales, végétales ou microbiennes destinée à des tests de qualité alimentaire, de diagnostic ou de sélection variétale. La PCR est encore indispensable à la réalisation d'un séquençage. Enfin, il existe des variantes de la PCR : real-time PCR, PCR compétitive, RT-PCR… [Dubourg].

4.2.1 But et principe de la PCR :

La PCR permet donc d'obtenir par réplication in vitro de multiples copies d'un fragment d'ADN à partir d'un extrait.

La PCR est une réaction de polymérisation en chaîne réalisée dans un mélange réactionnel qui comprend l'extrait d'ADN (ADN matriciel), la Taq polymérase, les amorces et les quatre désoxyriboNucléosides TriPhosphates (dNTP) en excès dans une solution tampon. Les tubes contenant le mélange réactionnel sont soumis à des cycles de température réitérés plusieurs dizaines de fois dans le bloc chauffant d'un thermocycleur. Cet appareil permet la programmation de la durée et de la succession des cycles de paliers de température. Chaque cycle comprend les trois étapes suivantes allant de quelques dizaines de secondes à quelques minutes [Ameziane, p.232-235] :

4.2.1.1 La dénaturation :

La première étape s'effectue à une température de 94°C, dite température de dénaturation. À cette température, l'ADN matriciel, qui sert de matrice au cours de la réplication, est dénaturé: les ADN double-brin se séparent en ADN simple-brin (ADN monocaténaires).

4.2.1.2 L'hybridation :

La deuxième étape s'effectue à une température généralement comprise entre 50 et 65°C, dite température d'hybridation des amorces. La diminution de la température permet aux liaisons hydrogène de se reformer et donc aux brins complémentaires de s'hybrider. Les amorces, étant de courtes séquences complémentaires, s'hybrident plus facilement que les longs brins d'ADN matriciel. Plus la température d'hybridation est élevée, plus l'hybridation est sélective, et plus elle est spécifique.

4.2.1.3 L'élongation ou l'extension :

La troisième étape s'effectue à une température de 72°C, dite température d'élongation. C'est à 72°C que se situe l'optimum d'efficacité de la Taq polymérase, laquelle catalyse la réplication en utilisant les dNTPs présents dans le mélange réactionnel. Les régions de l'ADN matriciel en aval des amorces sont ainsi sélectivement synthétisées.

Au cycle suivant, les fragments synthétisés au cycle précédent servent à leur tour de matrice et au bout de quelques cycles, l'espèce prédominante correspond à la séquence d'ADN comprise entre les régions où les amorces s'hybrident. Il faut compter 20 à 40 cycles pour synthétiser une quantité analysable d'ADN (environ 0,1 microgramme). Chaque cycle voit théoriquement doubler la quantité d'ADN présente au cours du cycle précédent.

A la fin des cycles, il est recommandé de rajouter un cycle final d'élongation à 60°C. Ce cycle est utile pour que l'ADN polymérase puisse terminer son élongation. Il faut savoir que la Taq polymérase tend à ajouter un nucléotide (Adénosine) à l'extrémité 3' de la séquence amplifiée, malgré l'absence de nucléotide en vis-à-vis sur le brin modèle. Lorsque l'ADN polymérase ne réussit pas à rajouter ce nucléotide sur tous les brins en construction, à cause d'un excès d'ADN initial ou par inhibition, nous obtenons aussi un fragment plus petit d'une paire de base. Le résultat obtenu sur le graphique de l'analyseur de fragments est la présence

de deux pics séparés par une seule paire de base. Ce phénomène porte le nom d'addition A incomplète.

Voici un schéma expliquant les différentes étapes de la PCR :

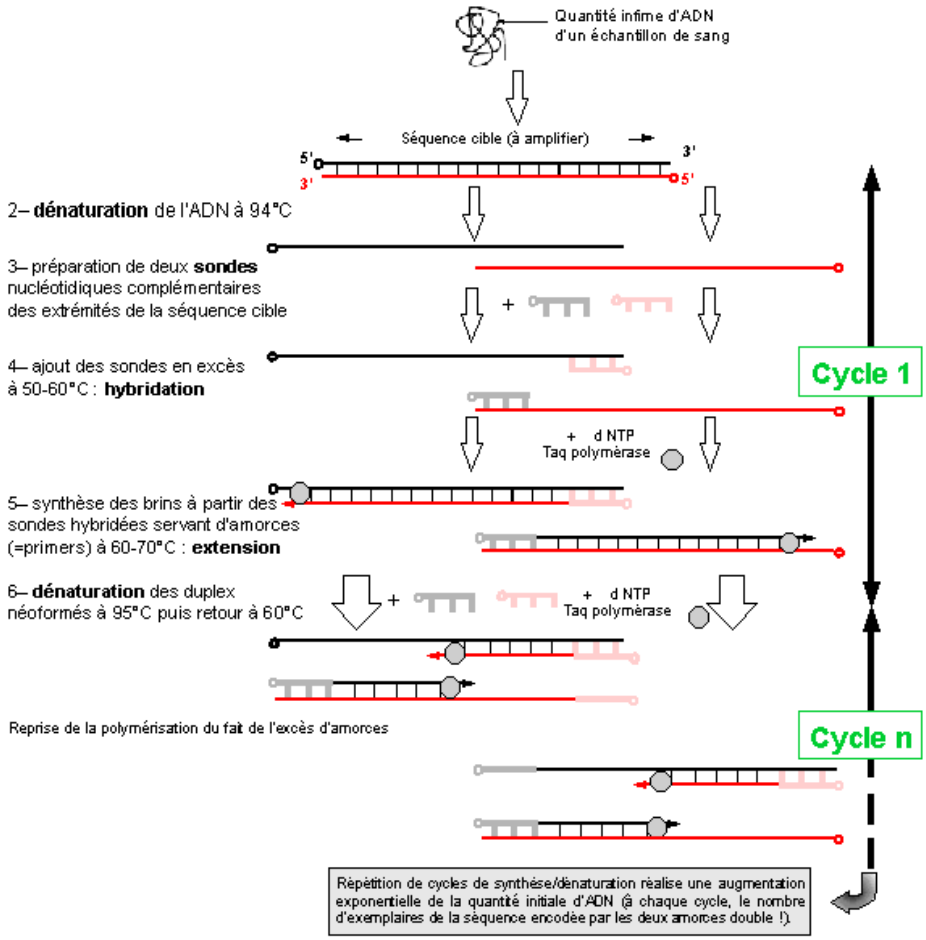

Quantité infime d'ADN
d'un échantillon de sang
Séquence cible (à amplifier)
5'
3'
3'
5'
2– dénaturation de l'ADN à 94°C
3– préparation de deux sondes
nucléotidiques complémentaires
des extrémités de la séquence cible
4– ajout des sondes en excès
à 50-60°C : hybridation
Cycle 1
+ d NTP
Taq polymérase
5– synthèse des brins à partir des
sondes hybridées servant d'amorces
(=primers) à 60-70°C : extension
6– dénaturation des duplex
néoformés à 95°C puis retour à 60°C
+ d NTP
Taq polymérase
Reprise de la polymérisation du fait de l'excès d'amorces
Cycle n
Répétition de cycles de synthèse/dénaturation réalise une augmentation
exponentielle de la quantité initiale d'ADN (à chaque cycle, le nombre
d'exemplaires de la séquence encodée par les deux amorces double !).

Figure [2]

4.2.1.4 La détection :

Le produit d'une PCR est constitué d'un ou de plusieurs fragments d'ADN (la ou les séquences d'intérêt). La détection et l'analyse des produits peuvent être très rapidement réalisées par électrophorèse sur gel d'agarose (ou d'acrylamide). L'ADN est révélé par une coloration au bromure d'éthidium. Ainsi, les produits sont visibles par transillumination aux ultraviolets (280 – 320 nm) [Ameziane, p.159]

Sur des systèmes automatisés, on utilise aujourd'hui un analyseur de fragment d'ADN (appareil d'analyse génétique ABI® Genetic Analyse 3130, par exemple). Cet appareil utilise le principe de l'électrophorèse capillaire (CE).
La détection des fragments est réalisée par une diode laser. Cela n'est possible que si la PCR est réalisée avec des amorces couplées à des fluorochromes.

4.2.2 Applications de la PCR :

Les applications de la PCR, comme citées précédemment étant nombreuses, je ne vais m'attarder que sur la PCR appliquée à l'identification. La PCR est remarquablement efficace pour identifier des espèces, des variétés ou des individus par profil ADN. Cette application repose sur les connaissances acquises en matière de structure du génome. Il s'agit tout simplement d'amplifier des séquences nucléotidiques qui soient spécifiques à l'espèce, à la variété ou à l'individu. Chez les eucaryotes notamment, ces séquences sont très nombreuses et offrent une vaste palette qui permet des identifications de manière très précise et très sélective. En effet, les génomes d'organismes eucaryotes comportent, à la différence des procaryotes, des séquences codantes et des séquences non codantes. Les séquences codantes correspondent aux gènes et sont donc traduites en protéines. Les séquences non codantes, qui ne sont donc pas traduites, représentent une large proportion de l'ADN génomique des eucaryotes [Jaunin, p.46].

Les séquences codantes (10-15% du génome) sont très homologues chez les individus d'une même espèce [Le Beillan, De la molécule à l'empreinte génétique]. En effet, l'espèce est caractérisée par des caractères communs qui sont garantis par ses gènes. Les différences phénotypiques entre les individus qui la composent reposent sur les variations alléliques et les différents allèles d'un même gène montrent des différences de séquence qui sont infimes. D'une espèce à l'autre, en fonction de la distance phylogénétique qui les sépare, les séquences des gènes qui codent pour la même fonction présentent des homologies très fortes, d'autant plus fortes que la fonction du gène est essentielle à l'embryogénèse ou au métabolisme. Par conséquence, les séquences codantes présentent peu d'intérêt en matière d'identification [Ameziane, p.12 et 42].

Par contre, les séquences non codantes (85-90% du génome) sont très polymorphes entre espèces comme entre individus d'une même espèce [Le Beillan, De la molécule à l'empreinte génétique]. Ce polymorphisme est la conséquence d'une accumulation de mutations au cours de l'évolution. Ces séquences présentent ainsi un large choix de marqueurs génétiques qui permettent d'établir des tests d'identification redoutablement discriminants. Parmi ces marqueurs nommés selon leur taille, on trouve notamment les minisatellites (ou VNTR, *variable number of tandem repeats*, en français : nombre variable de répétitions en tandem) et les microsatellites (ou STR, *short tandem repeats*, en français : courtes répétitions en tandem). Les VNTR et STR sont des polymorphismes de répétition composés de séquences qui se répètent en tandem. Ces séquences répétées mesurent de dix à quarante paires de bases pour les VNTR, de deux à dix paires de bases pour les STR. D'un individu à l'autre, la séquence répétée d'un VNTR ou d'un STR est identique mais le nombre de répétitions, et donc la taille du VNTR ou du STR peuvent être très variables [Ameziane, p.12 et 42].

La mise en évidence du polymorphisme d'un STR ou d'un VNTR se fait par PCR à l'aide d'amorces qui s'hybrident aux séquences non polymorphes flanquantes. Le ou les produits d'amplification sont ensuite analysés soit sur gel d'agarose, soit à l'aide d'un analyseur de fragments d'ADN [Dubourg].

Schéma d'un microsatellite :

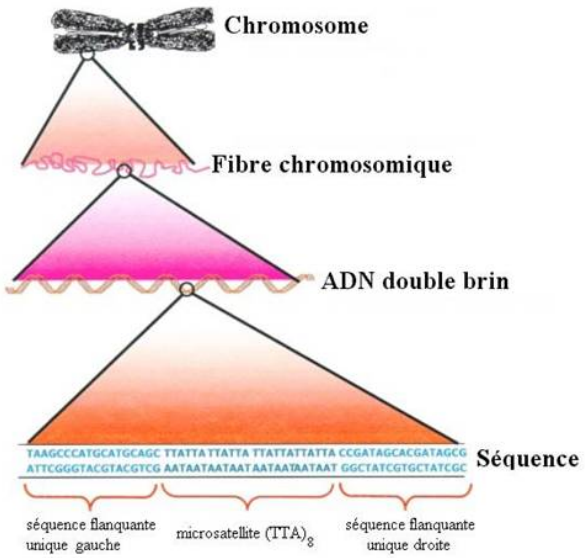


Figure [3]

Il est aujourd'hui possible d'amplifier simultanément plusieurs STR ou VNTR en utilisant plusieurs couples d'amorces. La variété des produits d'amplification obtenus permet d'aboutir à des profils qui sont spécifiques des individus.

4.2.3 Avantages et inconvénients de la PCR :

La PCR est une technique très sensible qui permet rapidement d'obtenir une grande quantité d'ADN analysable à partir de quelques copies d'ADN matriciel contenues dans le prélèvement ou à partir d'ADN dégradé, ce qui est fort utile pour la génétique forensique. Mais cette technique a ses limites qui sont souvent causées par ses propres avantages [Berthe].

Du fait de sa sensibilité, les risques de contaminations sont élevés. L'origine de ces contaminations sont diverses: elles peuvent provenir par exemple, d'un mauvais prélèvement de l'échantillon ou par les réactifs qui sont contaminés avec de l'ADN.

Un autre inconvénient de la PCR est l'inhibition de l'ADN polymérase par des substances contenues dans l'échantillon. Certaines de ces substances sont connues, par exemple, l'hème, l'héparine, l'acide humique, les colorants et d'autres ne le sont pas, par exemple, certaines substances contenues dans l'urine ou dans le liquide céphalorachidien [Ameziane, p.239].

Il existe différentes techniques pour diminuer, voir faire disparaître l'inhibition :

- Il est possible de diluer l'échantillon avec de l'eau stérile. Cela permettra de diminuer la concentration des substances inhibitrices et donc augmenter les chances qu'il y ait moins d'inactivation de l'ADN polymérase.
- Une autre technique consister à effectuer une purification complémentaire de l'extrait d'ADN, car il peut être contaminé par des protéines ou des substances restantes lors de l'extraction (par exemple, l'alcool).
- Une autre possibilité serait de changer d'ADN polymérase, car certaines polymérases sont plus résistantes aux inhibiteurs que d'autres. C'est le cas pour la Tth ADN polymérase et la Tfl ADN polymérase.
- Une autre méthode consiste à rajouter un leurre sur lequel les substances inhibitrices se fixeront, par exemple, l'albumine du sérum bovin (BSA).
- Et la dernière méthode est d'augmenter la quantité de l'ADN polymérase.

Les techniques citées ci-dessus sont utiles lorsque nous suspectons que l'absence de résultat soit due à l'inhibition. Mais elles ne servent à rien si l'absence de résultat est due à l'absence d'ADN dans l'extrait. Une des méthodes pour savoir s'il y a de l'ADN dans l'extrait, c'est de le quantifier : soit en utilisant la spectrométrie à 260 nm, soit en faisant une PCR en temps réel, soit en utilisant des kits, par exemple le Quantifiler® kit d'Applied Biosystems [user guide AmpFlSTR® MiniFiler™, ch. 1-6].

Il faut tenir compte que l'absence de résultat, lorsque nous sommes en présence d'une inhibition, est provoquée par une forte concentration en inhibiteurs. Si nous en diminuons la concentration, il est possible d'obtenir un profil partiel. Ceci est expliqué par le fait que la Taq polymérase a une affinité chimique pour ces substances inhibitrices. Donc, plus y en a plus, plus la Taq est inhibée et vice versa [Coquoz, p.190].

En résumé, l'activité de la Taq polymérase dépend de la concentration en substances inhibitrices. Elle peut donc être totalement inhibée ou diminuée. Si l'activité est diminuée, il n'y a que les fragments de petites tailles qui sont assez amplifiés pour pouvoir être détectés (obtention d'un profil partiel).

5 But

Notre but est d'éviter d'avoir à effectuer une analyse préalable pour certifier la présence d'ADN dans l'extrait, mais de rajouter un ADN animal ou végétal directement dans notre tube PCR. L'ADN choisi va être amplifié en même temps que notre extrait permettant ainsi, de dire si l'absence de profil est provoqué par de l'inhibition ou par l'absence d'ADN dans notre échantillon. Cette information supplémentaire nous évite ainsi, de faire des manipulations supplémentaires pour lever l'inhibition, alors qu'il n'y a pas d'ADN.

6 Développement

6.1 Matériel

6.1.1 Les kits

6.1.1.1 Domaine d'application et principe des kits :

A l'exception du kit AmpFlSTR® Yfiler™, ces kits sont des multiplex qui permettent l'amplification de plusieurs marqueurs STR situés sur différents chromosomes. Ils sont utiles dans les profils ADN, dans les tests en paternité, dans les analyses forensiques et dans l'identification de souche de culture cellulaire.

Liste des principaux STR figurant dans la panoplie des laboratoires :

Nom usuel du STR	Elément répétitif	Localisation chromosomique	Gamme d'allèles connus	Pouvoir de discrimination*	Référence GenBank
TH01 (TC11)	4 bp (TCAT)	11p15.5	3-13.3	92%	D00269
VWA	4 bp (TCTA)	12p13.31	9-25	94%	M25858
D21S11	4 bp (TCTA)	21q21.1	24-38	95%	AP000433
FGA (FIBRA)	4 bp (CTTT)	4q31.3	13-51.2	96%	M64982
D18S51	4 bp (AGAA)	18q21.33	7-27	97%	L18333
TPOX	4 bp (GAAT)	2p25.3	6-13	77%	M68651
CSF1PO	4 bp (TAGA)	5q33.1	6-16	89%	X14720
D16S539	4 bp (GATA)	16q24.1	5-15	91%	G07925
D7S820	4 bp (GATA)	7q21.11	6-15	94%	G08616
D13S317	4 bp (TATC)	13q31.1	5-15	91%	G09017
D5S818	4 bp (AGAT)	5q23.2	7-16	88%	G08446
D3S1358	4 bp (TCTA)	3q21.31	9-20	92%	NT_005997
D8S1179	4 bp (TCTA)	8q24.13	5-19	94%	G08710
D2S1338	4 bp (TGCC)	2q35	15-28	96%	G08202
D19S433	4 bp (AAGG)	19q12	9-17.2	94%	G08036
ACTBP2 (SE33)	4 bp (AAAG)	6q15	4.2-37	98%	V00481
penta E	5 bp (AAAGA)	15q26.2	5-24	97%	AC027004
penta D	5 bp (AAAGA)	21q22.3	2.2-17	94%	AP001752

*Données provenant pour l'essentiel de Gehring, 1999.

Figure [4]

Ces kits ont été conçus pour employer la capacité de détection multicolorée de l'appareil d'analyse génétique ABI® Genetic Analyse 3130, par exemple. Une des amorces de chaque marqueur amplifié par ces kits est couplée à un fluorochrome. Ces substances fluorescentes qui émettent à différentes longueurs d'onde, sont détectées sur l'ABI dans le bleu, le vert, le jaune, le rouge et dans l'orange selon leur longueur d'onde. Ces différences de longueur d'onde permettent ainsi la coamplification simultanée de différents marqueurs avec des gammes de taille se chevauchant dans un seul tube PCR et la détection en une seule injection (sur ABI) ou sur un seul puit si c'est sur gel.

Schéma des différentes émissions des cinq fluorochromes pour AmpFlSTR® Yfiler™ et AmpFlSTR® Minifiler™ :

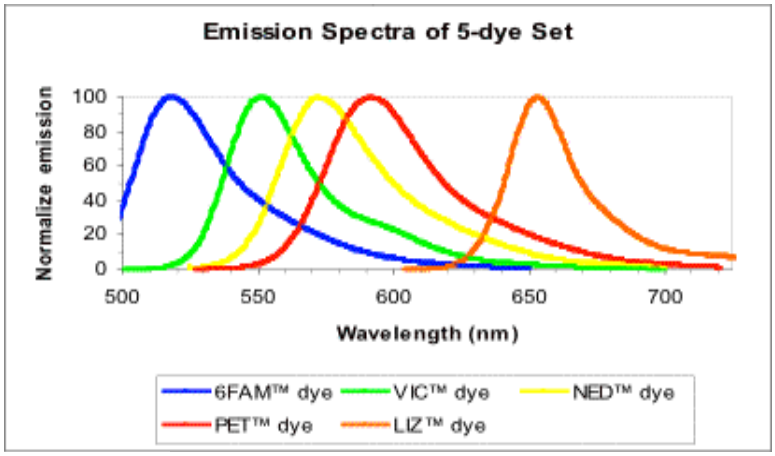


Figure [5]

6.1.1.2 Kit PowerPlex® 16 System

Principe :

Le kit PowerPlex® 16 System permet la coamplification et la détection de seize marqueurs (quinze marqueurs STR et l'amélogénine déterminant le sexe). Ce kit permet l'amplification des marqueurs suivants: Penta E, D18S51, D21S11, TH01, D3S1358, FGA, TPOX, D8S1179, Vwa, amélogénine, Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S8220, D13S317 et D5S818.
Une des deux amorces pour les marqueurs Penta E, D18S51, D21S11, TH01 et D3S1358 est marqué à la fluorescéine (FL™). Pour les marqueurs FGA, TPOX, D8S1179, Vwa et l'amélogénine, une des deux amorces est marquée à la carboxy-tetramethylrhodamine (TMR™). Et pour les marqueurs suivants Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S8220, D13S317 et D5S818, l'amorce fluorescente est marquée par du 6-carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein (6-JOE™) [Technical manuel PowerPlex® System 16, p.2].

Schéma des tailles des allèles possibles :

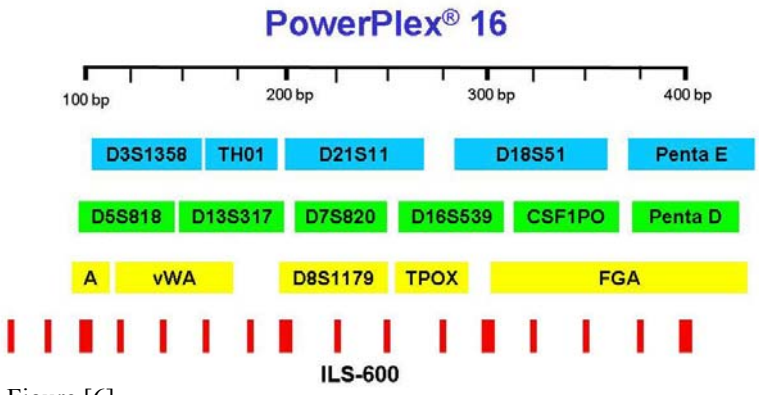


Figure [6]

Composition : [Technical manuel PowerPlex® System 16, p.4]

- Gold ST*R 10x Buffer
- PowerPlex® 16 10x Primer Pair Mix
- Control DNA 9947A (10 ng/µl)
- PowerPlex® 16 Allelic Ladder Mix
- Internal Lane Standard (ILS) 600
- PowerPlex® Matrix Standards, 310
- PowerPlex® Matrix Standards, 3100/3130
- Mineral Oil
- Nuclease-free Water

MasterMix PCR :

Selon le manuel technique du kit PowerPlex® System 16 [p.8], le volume final de MasterMix est de 25 µl. Nous avons juste diminué le volume de MasterMix à 12.5 µl tout en gardant les proportions des réactifs :

MasterMix (MM) PCR pour un échantillon:

2.45 µl H_2O
1.30 µl Gold ST*R 10x Buffer
1.30 µl PowerPlex® 16 10x Primer Pair Mix
0.45 µl AmpliTaq Gold® DNA polymerase (5U/µl)

Distribuer 5 µl de MM dans chaque tube PCR. Ajouter X µl d'ADN et (7.5-X) µl d'H_2O.

Programme PCR : [Technical manuel PowerPlex® System 16, p.10]

Le programme utilisé pour notre PCR est le suivant :

PowerPlex® 16 System	32 cycles	[95°C/11'; 96°C/1' ; 10x (94°C/30'' ; 60°C/30'' ; 70°C/45'') ; 22x (90°C/30'' ; 60°C/30'' ; 70°C/45'') ; 60°C/30'' ; 4°C/pause]

Sur l'analyseur de fragments : [Protocole du laboratoire]

Préparer un mix formamide/standard interne. Pour N échantillons, préparer :

N x 10 µl Hi-Di formamide
N x 0.3 µl ILS 600 size standard

Ajouter 10 µl de mix formamide/standard interne dans les microtubes pour ABI et 1 µl d'amplifiat obtenu.

6.1.1.3 Kit AmpFlSTR® SGM Plus™

Principe :

Le kit AmpFlSTR® SGM Plus™ permet la coamplification et la détection de onze marqueurs (dix marqueurs STR et l'amélogénine). Ce kit permet l'amplification des marqueurs suivants: D3S1358, Vwa, D16S539, D2S1338, amélogénine, D8S1179, D21S11, D18S51, D19S433, TH01 et FGA.
Pour les quatre premiers marqueurs, une des deux amorces est couplée au fluorochrome 5-carboxyfluorescein (5-FAM™). Pour les marqueurs suivants: amélogénine, D8S1179, D21S11, D18S51, l'amorce fluorescente est marquée au fluorochrome 6-carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein (6-JOE™). Et pour les trois derniers marqueurs, une des deux amorces est couplée au fluorochrome 2'-chloro-5'-fluoro-7',8'-fused phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein (NED™) [user's manual AmpFlSTR® SGM Plus™, ch. 1-5 à 1-9].

Schéma des tailles des allèles possibles :

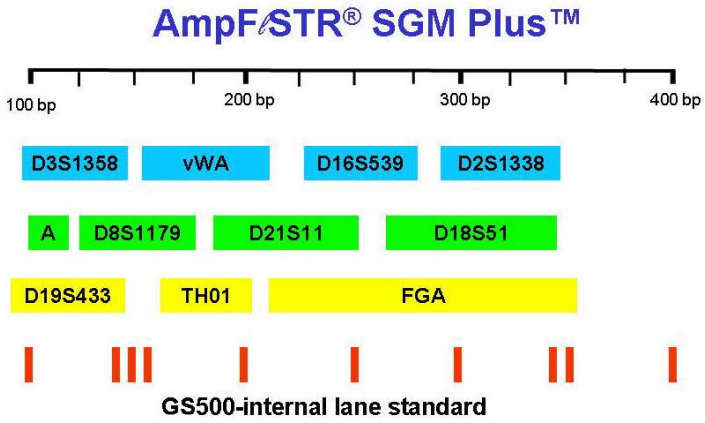


Figure [7]

Composition : [user's manual AmpFlSTR® SGM Plus™, ch. 1-10]

- AmpFlSTR® PCR Reaction Mix
- AmpFlSTR® SGM Plus™ Primer Set
- AmpFlSTR® Control DNA 007 (0.10ng/µl)
- AmpFlSTR® SGM Plus™ Allelic Ladder

Matériels indispensables mais non fournis par le kit :

- GeneScan™-500 [ROX]® Size Standard Kit
- Matrix Standard Set DS-32 (5-FAM™, JOE™, NED™, ROX™ dyes) for use with 3100 and 3100-Avant systems

MasterMix PCR :

Selon le manuel d'utilisation du kit AmpFlSTR® SGM Plus™ [ch. 5-3], le volume final de MasterMix est de 30 µl. Nous avons juste diminué le volume de MasterMix à 12.5 µl tout en gardant les proportions des réactifs :

MasterMix (MM) PCR pour un échantillon :
5.25 µl AmpFlSTR® PCR Reaction Mix
2.75 µl AmpFlSTR® SGM Plus™ Primer Set
0.125 µl AmpliTaq Gold® DNA polymerase (5U/µl)

Distribuer 7.5 µl de MM dans chaque tube PCR. Ajouter X µl d'ADN et (5-X) µl d'H_2O.

Programme PCR : [user's manual AmpFlSTR® SGM Plus™, ch. 5-2]

Le programme utilisé pour notre PCR est le suivant :

AmpFlSTR® SGM Plus™	28 cycles	[95°C/11' ; 28x (94°C/1' ; 59°C/1' ; 72°C/1') ; 60°C/45' ; 25°C/pause]

Sur l'analyseur de fragments : [Protocole du laboratoire]

Préparer un mix formamide/standard interne. Pour N échantillons, préparer :

N x 10 µl Hi-Di formamide
N x 0.125 µl GeneScan™-500 [ROX]® Size Standard

Ajouter 10 µl de mix formamide/standard interne dans les microtubes pour ABI et 1 µl d'amplifiat obtenu.

6.1.1.4 Kit AmpFlSTR® MiniFiler™

Principe :

Le kit AmpFlSTR® MiniFiler™ est un kit optimisé pour l'amplification d'échantillons d'ADN dégradés et/ou inhibés. Huit marqueurs autosomaux STR et le marqueur amélogenine déterminant le sexe sont amplifiés dans une seule réaction PCR.
Ce kit permet l'amplification des marqueurs suivants: D13S317, D7S820, amélogénine, D2S1338, D21S11, D16S539, D18S51, CSF1PO et FGA.
Pour les deux premiers marqueurs, une des deux amorces est couplée au fluorochrome 6-carboxyfluorescein (6-FAM™). Pour les marqueurs suivants: amélogénine, D2S1338, D21S11, l'amorce fluorescente est marquée au fluorochrome VIC®. Et pour les marqueurs D16S539, D18S51, une des deux amorces est couplée au fluorochrome 2'-chloro-5'-fluoro-7',8'-fused phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein (NED™). Et pour les deux derniers marqueurs, l'amorce marquée est couplée au fluorochrome PET® [user guide AmpFlSTR® MiniFiler™, ch. 1-2 à 1-4].

Schéma des tailles des allèles possibles :

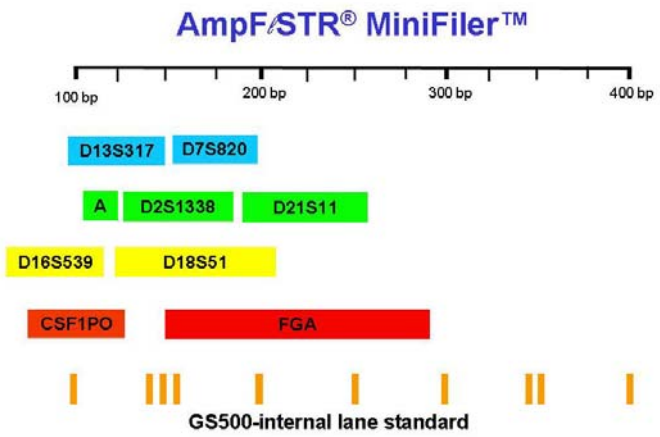


Figure [8]

Composition : [user guide AmpFlSTR® MiniFiler™, ch. 1-9]

- AmpFlSTR® MiniFiler™ Primer Set
- AmpFlSTR® MiniFiler™ Master Mix
- AmpFlSTR® MiniFiler™ Allelic Ladder
- AmpFlSTR® Control DNA 007 (0.10 ng/µl)

Matériels indispensables mais non fournis par le kit :

- GeneScan™-500 [LIZ]® Size Standard Kit
- DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5)

MasterMix PCR :

Selon l'user guide du kit AmpFlSTR® MiniFiler™ [ch. 2-7], le volume final de MasterMix est de 15 µl. Nous avons juste diminué le volume de MasterMix à 6 µl tout en gardant les proportions des réactifs :

MasterMix (MM) PCR pour un échantillon:
4 µl AmpFlSTR® MiniFiler™ Master Mix
2 µl AmpFlSTR® MiniFiler™ Primer Set

Distribuer 6 µl de MM dans chaque tube PCR. Ajouter X µl d'ADN et (4-X) µl d'H_2O.

Programme PCR : [user guide AmpFlSTR® MiniFiler™, ch. 2-9]

Le programme PCR utilisé pour notre PCR est le suivant :

AmpFlSTR® MiniFiler™	25 ou 30 cycles	[95°C/11' ; 25x ou 30x (94°C/20'' ; 59°C/2' ; 72°C/1') ; 60°C/45' ; 4°C/pause]

Sur l'analyseur de fragments : [Protocole du laboratoire]

Préparer un mix formamide/standard interne. Pour N échantillons, préparer :

N x 10 µl Hi-Di formamide
N x 0.15 µl GeneScan™-500 [LIZ]® Size Standard

Ajouter 10 µl de mix formamide/standard interne dans les microtubes pour ABI et 1 µl d'amplifiat obtenu.

6.1.1.5 Kit AmpFlSTR® Yfiler™

Principe :

Le kit AmpFlSTR Yfiler™ permet la coamplification et la détection de dix-sept marqueurs STR se trouvant sur le chromosome Y. Ce kit permet l'amplification des marqueurs suivants: DYS456, DYS389I, DYS390, DYS389II, DYS458, DYS19, DYS385 a/b, DYS393, DYS391, DYS439, DYS635, DYS392, Y-GATA H4, DYS437, DYS438, DYS448.
Pour les cinq premiers marqueurs, une des deux amorces est couplée au fluorochrome 6-carboxyfluorescein (6-FAM™). Pour les marqueurs suivants: DYS458, DYS19, DYS385 a/b, l'amorce fluorescente est marquée au fluorochrome VIC®. Et pour les cinq marqueurs suivants, une des deux amorces est couplée au fluorochrome 2'-chloro-5'-fluoro-7',8'-fused phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein (NED™). Et pour les quatre derniers, les amorces marquées sont couplées au fluorochrome PET® [user's manual AmpFlSTR® YFiler™, ch. 1-2 à 1-3].

Schéma des tailles des allèles possibles :

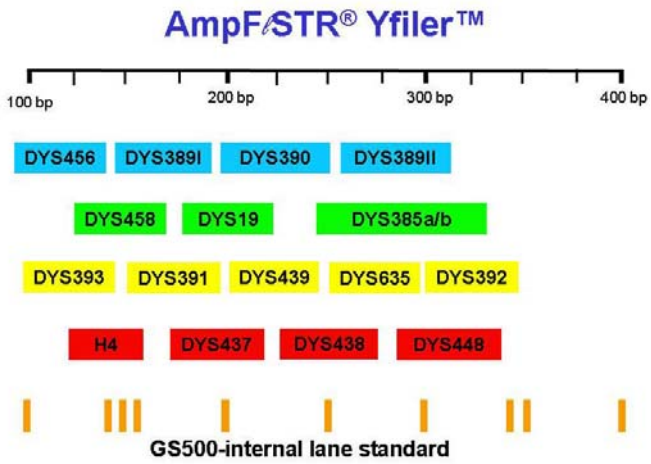


Figure [9]

Composition : [user's manual AmpFlSTR® YFiler™, ch. 1-7]

- AmpFlSTR Yfiler Primer Set
- AmpFlSTR Yfiler PCR Reaction Mix
- AmpFlSTR Yfiler Allelic Ladder
- AmpliTaq Gold® DNA Polymerase
- AmpFlSTR Control DNA 9947A (10 ng/µl)
- AmpFlSTR® Control DNA 007 (0.10 ng/µl)

Matériels indispensables mais non fournis par le kit :

- GeneScan™-500 [LIZ]™ Size Standard Kit
- DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5)

MasterMix PCR :

Selon le manuel d'utilisation du kit AmpFlSTR® YFiler™, ch. 3-6, le volume final de MasterMix est de 15 µl. Nous avons juste diminué le volume de MasterMix à 10 µl tout en gardant les proportions des réactifs.

MasterMix (MM) PCR pour un échantillon:

3.7 µl AmpFlSTR Yfiler PCR Reaction Mix
2 µl AmpFlSTR Yfiler Primer Set
0.3 µl AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (5U/µl)

Distribuer 6 µl de MM dans chaque tube PCR. Ajouter X µl d'ADN et (4-X) µl d'H_2O.

Programme PCR : [user's manual AmpFlSTR® YFiler™, ch. 3-8]

Le programme utilisé pour notre PCR est le suivant :

AmpFlSTR® Yfiler™	30 cycles	[95°C/11' ; 30x (94°C/1' ; 61°C/1' ; 72°C/1') ; 60°C/80' ; 4°C/pause]

Sur l'analyseur de fragments : [Protocole du laboratoire]

Préparer un mix formamide/standard interne. Pour N échantillons, préparer :

N x 10 µl Hi-Di formamide
N x 0.15 µl GeneScan™-500 [LIZ]® Size Standard

Ajouter 10 µl de mix formamide/standard interne dans les microtubes pour ABI et 1 µl d'amplifiat obtenu.

6.1.2 Thermocycleur T3000 ou autre:

Figure [10]

Cet appareil, conçu par la firme Biometra, est utilisé dans le cadre de l'amplification des acides nucléiques. Il est constitué de trois blocs chauffants, permettant ainsi la programmation de la durée et de la succession des cycles des paliers de température pour trois PCR différentes.

6.1.3 ABI Genetic Analyser 3130 :

Domaine d'application et principe:

Cet appareil permet la séparation des acides nucléiques obtenus en PCR selon leur taille. Les séparations se font dans un capillaire d'environ 50 µm de diamètre, permettant ainsi de réguler facilement la température et d'utiliser des tensions électriques beaucoup plus élevées [Coquoz, p.41]. La longueur de ce capillaire peut varier de 20 à 50 cm. Il est revêtu à l'intérieur de silice fondue et est rempli d'un gel. Ce gel est composé d'une solution visqueuse de polydimethylacrylamide 4%, urée 8M, 2-pyrrolidione 5%. La séparation est effectuée sous l'application d'un champ électrique de voltage élevé. Sous l'effet de ce champ électrique et du tampon, les amplifiats chargés négativement rentrent dans le capillaire et migrent en direction de l'anode. La migration est très rapide: de 45 mn à une heure. Ensuite, les amplifiats passent devant une fenêtre optique où la détection s'effectue. La détection est assurée par une mesure en UV ou bien par fluorescence après excitation par laser ou par lampe halogène [Ameziane, p.167].

Il faut prendre en compte que l'analyse des STR en multiplex, ne peut se faire qu'avec l'aide de l'informatique. En effet, les fluorochromes utilisés pour la multiplex, ne sont pas différenciables à l'œil nu et leur spectre d'émission se chevauchent [figure 4]. Seuls des logiciels adaptés sont capables de récolter les données, distinguer les couleurs, reconnaître les pics, déterminer la taille des amplifiats et identifier les allèles pour ainsi obtenir un résultat final sous la forme d'une série de graphiques de pics détectés (p. ex: GeneMapper) [Coquoz p.100-102].

Conditions d'analyse d'électrophorèse pour chaque kit [Protocole du laboratoire] :

Module Manager pour kit:	***PowerPlex® System 16***	***AmpFlSTR® SGM Plus™***	***AmpFlSTR® MiniFiler™***	***AmpFlSTR® YFiler™***
Type :	Regular	Regular	Regular	Regular
Template :	HIDIFragmentAnalysis36_POP4	HIDIFragmentAnalysis36_POP4	HIDIFragmentAnalysis36_POP4	HIDIFragmentAnalysis36_POP4
Oven Temperature :	60	60	60	60
Poly Fill Vol :	4840	4840	4840	4840
Current Stability :	5.0	5.0	5.0	5.0
Pre Run Voltage :	15	15	15	15
Pre Run Time :	180	180	180	180
Injection Voltage :	3	3	1.2	1.2
Injection Time :	12	5	12	12
Voltage Numbers of Steps :	40	40	40	40
Voltage Step Interval :	15	15	15	15
Data Delay Time :	1	1	1	1
Run Voltage :	15	15	15	15
Run Time :	1750	1500	1320	1500

Il est à noter que chaque kit possède ses propres paramètres décrits ci-dessus d'électrophorèse capillaire sur l'appareil. Il est nécessaire de modifier le temps de migration (Run time) pour que le pic de notre contrôle d'inhibition (CI) soit visible sur le profil. Le CI étant un fragment de grande taille (explications p.25), le temps de migration a été rallongé à 2200 secondes pour tous les kits.

Les applications d'un analyseur de fragments sont très nombreuses, voici quelques exemples:

- Séquençage,
- Analyse de mutation,
- Identification d'allèles,
- Analyse de microsatellites (STR)

Schéma d'un ABI Genetic Analyser 3130:

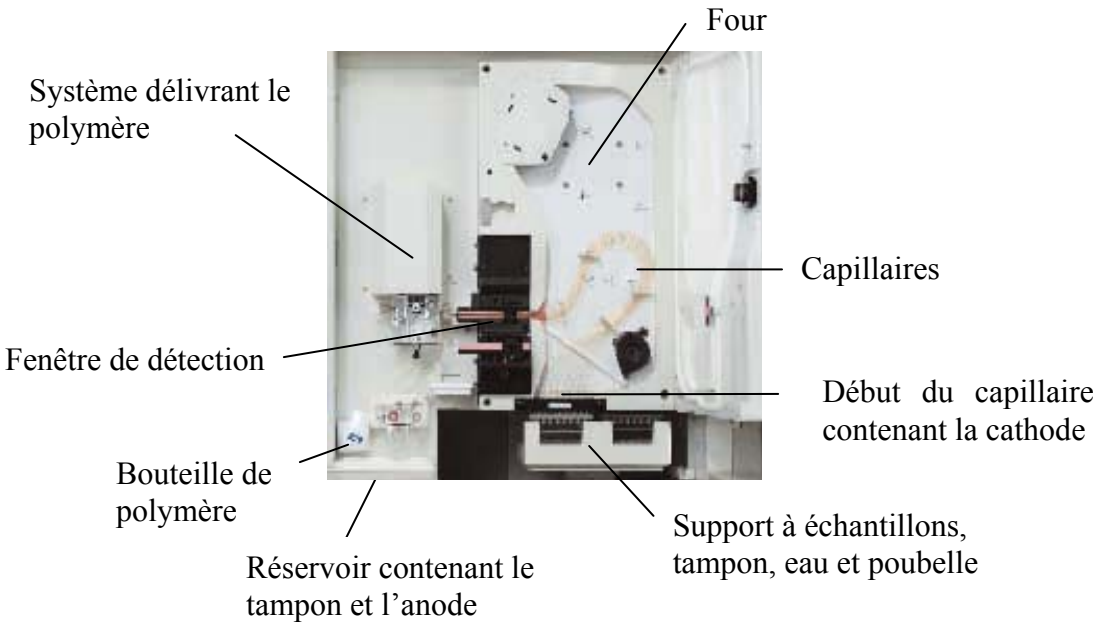


Figure [11]

6.1.4 Autre matériel nécessaire

- Pipettes
- Embouts avec filtre
- Vortex
- Centrifugeuse
- Gants sans poudre
- Kit d'isolation d'ADN ou phénol-chloroforme
- Tubes de 2 ml avec bouchon
- Microtubes pour PCR
- AmpliTaq Gold® DNA polymerase (5U/µl) par Applied Biosystem
- Tubes pour ABI
- Hi-Di™ Formamide par Applied Biosystem
- POP-4 Polymère pour appareil ABI Genetic Analyse 3130 par Applied Biosystem
- Running Buffer 10x par Applied Biosystem
- GeneMapper® ID Software v3.2 par Applied Biosystems

6.1.5 Matériel biologique

6.1.5.1 Le contrôle d'inhibition (CI)

La séquence du contrôle d'inhibition choisie se situe sur le gène Galactose-1-phosphatase uridyl transférase [réf: *NT_166289.1*; Annexe 1, depuis séquence nucléotides 10155302-10156200] du chromosome 4 de l'ADN de souris (MOUSE GENOMIC DNA/G309A, fournisseur : Promega).
Cette séquence a été choisie pour des raisons de commodité. L'ADN de souris étant déjà utilisé dans d'autres analyses de PCR, nous avons déjà une paire d'amorces (GALT-F et GALT-R) amplifiant une séquence sur ce gène. A partir de ces amorces, nous avons choisi deux autres amorces (GALT-F2 et GALT-R2) qui nous permettent d'amplifier un fragment de taille voulue. Le couple d'amorces GALT-F et GALT-R2 et la paire d'amorces GALT-F2 et GALT-R vont donc, amplifier deux régions partiellement différentes.

Les deux amorces GALT-F2 et GALT-R2 ont été choisies pour satisfaire les critères suivants :

a. Selon le Dr. R. Coquoz, plus le fragment est long, plus la sensibilité de la PCR face à des substances inhibitrices augmente. Suivant la concentration en inhibiteurs, l'action de la Taq polymérase peut être inhibée totalement ou partiellement, auquel cas les fragments de petites tailles seront malgré tout un peu amplifiés [communication personnelle].

b. L'amplifiat obtenu ne doit pas interférer avec les marqueurs des kits. En d'autres termes, il ne doit pas donner un pic dans la gamme de taille des allèles des marqueurs, car il peut être confondu avec un allèle et nous ne saurons pas si nous sommes face au CI ou face à un vrai allèle. Selon les figures [5] à [8] et les manuels d'utilisation des kits, le plus grand marqueur de tous les kits se trouve dans le kit PowerPlex® 16 System [Promega, p.49]. Il se nomme Penta E et il fournit des allèles s'étalant entre 379-474 paires de bases (pb). Donc, la séquence amplifiée de notre CI, doit être supérieure ou égale à 480 pb. Mais, elle ne doit pas non plus être trop grande, car il faudrait trop augmenter le temps de migration, ce qui ne serait guère intéressant.

A partir de la séquence de l'ADN de souris, des amorces GALT-F et GALT-R et grâce au logiciel de conception d'amorces Primer3 [Rozen], nous trouvons les deux autres amorces. Ces paires d'amorces amplifient chacune un fragment de 480 pb [Annexe 1]. Il ne reste plus qu'à choisir le fluorochrome qui sera fixé sur les amorces GALT-F2 et GALT-R2 choisies.

Selon les figures [5] à [8] et les manuels d'utilisation des kits, tous les kits possèdent en commun le fluorochrome fluorescéine [FAM^{TM}]. Donc, nous avons décidé de marquer les amorces avec ce fluorochrome. Il sera fixé sur l'extrémité 5', pour éviter de perturber la Taq lors de la phase d'élongation.

Amorces déjà disponible au laboratoire Aurigen (fournisseur : Microsynth):
GALT-F à 100 µM: 5'-TGG CGC AGA AAG ACA AGG A-3'
GALT-R à 100 µM: 5'-CAA AGA TTC AAG GCC CTG ATG-3'

Amorces choisies (fournisseur : Microsynth):
GALT-R2 à 100 µM: 5'-FAM-CAG TCT CAC CAA GCT ACC CTG A-3'
GALT-F2 à 100 µM: 5'-FAM-GCT CCA CGC CCA CTA CTA CC-3'

6.1.5.2 Extraits divers

a) Nous avons exploité d'anciens extraits utiles pour observer l'action de notre CI. Certains extraits contenaient des substances inhibitrices et d'autres donnaient un profil partiel.

b) Nous avons utilisé un extrait d'ADN d'un patient comme contrôle et une solution en hème obtenus à partir du sang de ce patient :

Estimation de la concentration en hème :

Masse moléculaire de l'hémoglobine: 65 600g/mol [communication personnelle]

Concentration de l'hémoglobine dans le sang: env. 120 g/l [communication personnelle]

$\frac{65600}{4\ hèmes} = 16400\ g/mol$ $\qquad$ $\frac{120\,g/l}{16400\,g/mol} = 7.3\times10^{-3}\,M$ d'hème dans le sang

$\frac{7.3\times10^{3}\ \mu M}{1000\ \mu M} = 7.3\times$ → 10 µl de sang + 63 µl d' H2O pour une concentration en hème de 1000 µM. A partir de cette solution mère, nous effectuons différentes dilutions.

Extraction avec le kit JetQuick Blood Spin Kit de Genomed (cat. 440250) :

La concentration en ADN de l'extrait a été obtenue en admettant une concentration en ADN de 30 ng/µl de sang et un rendement d'extraction de 100%.

6.2 Schéma général de la stratégie choisie

Tout d'abord, l'ADN de l'échantillon doit être extrait. L'extraction peut se faire grâce à des kits (JetQuick Blood Spin Kit de Genomed ou DNA IQ™ System de Promega (cat. DC6700)) ou par la méthode phénol-chloroforme. Ensuite, nous utilisons les kits PowerPlex® 16 System, AmpFlSTR® SGM Plus™, AmpFlSTR® MiniFiler™ ou AmpFlSTR® Yfiler™ pour amplifier les marqueurs qui nous intéressent. Lorsque le MasterMix est prêt, nous rajoutons 1µl du CIMIX 10 ou du CIMIX 12.5, selon le volume final de la PCR. Le CIMIX 10 et le CIMIX 12.5 sont des mélanges prêts à l'emploi contenant l'ADN de souris et la paire d'amorces permettant d'amplifier la séquence servant de contrôle d'inhibition pour un volume final PCR de 10 µl et de 12.5 µl.

Schéma de la méthode finale:

EXTRACTION DE L'ECHANTILLON

↓

PREPARATION DU MASTERMIX SELON LES KITS

↓

AJOUT DU CIMIX 10 OU 12.5

↓

AJOUT DE LA QUANTITÉ ADÉQUATE D'EXTRAIT

↓

AMPLIFICATION PAR PCR

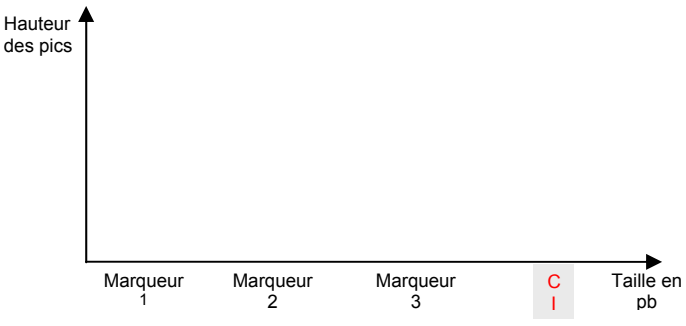
↓

MIGRATION PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE

↓

ANALYSE :

EX. DE PROFIL SANS L'AMPLIFIAT CI

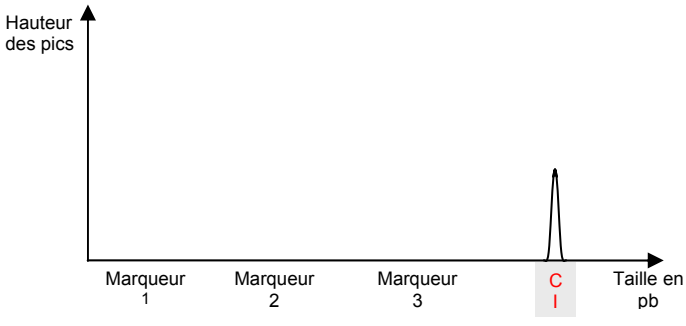


RESULTAT: INHIBITION

↓

Utiliser des techniques adéquates pour bloquer les inhibiteurs ou s'en débarrasser.

EX. DE PROFIL AVEC L'AMPLIFIAT CI



RESULTAT: PAS D'INHIBITION

↓

OK, on peut rendre le résultat : il n'y a pas d'ADN exploitable dans l'extrait.

6.3 Essais réalisés

6.3.1 Premier essai: amplification et choix de la concentration optimale de l'ADN de souris.

6.3.1.1 But

Pour commencer, nous voulons tester les amorces pour vérifier si nous obtenons un amplifiat en choisissant un programme PCR qui va donner le plus de chance aux amorces de s'amplifier (programme ayant la température d'hybridation la plus basse).

En parallèle, nous testons différentes concentrations d'ADN de souris pour obtenir la concentration optimale. Cette concentration doit nous permettre de voir un pic d'une taille entre 500 et 5000 rfu.

6.3.1.2 Méthode

Calcul du PCR mix pour vérifier la qualité de l'amplification des amorces :
(Condition : Amorces seules, volume final (v_f) : 25 µl)

Gold ST*R 10x Buffer (Kit PowerPlex® System 16)	→	Buffer 1x	→	2.5 µl
$MgCl_2$ (25mM)	→	$MgCl_2$ (1.5mM)	→	1.5 µl
dNTP (25 mM)	→	dNTP (0.2 mM)	→	0.2 µl
Amorces (100 µM)	→	Amorces (0.5 µM)	→	0.125 µl
AmpliTaq Gold (5U/µl)	→	AmpliTaq 2U	→	0.4 µl
				4.725 µl de Mix

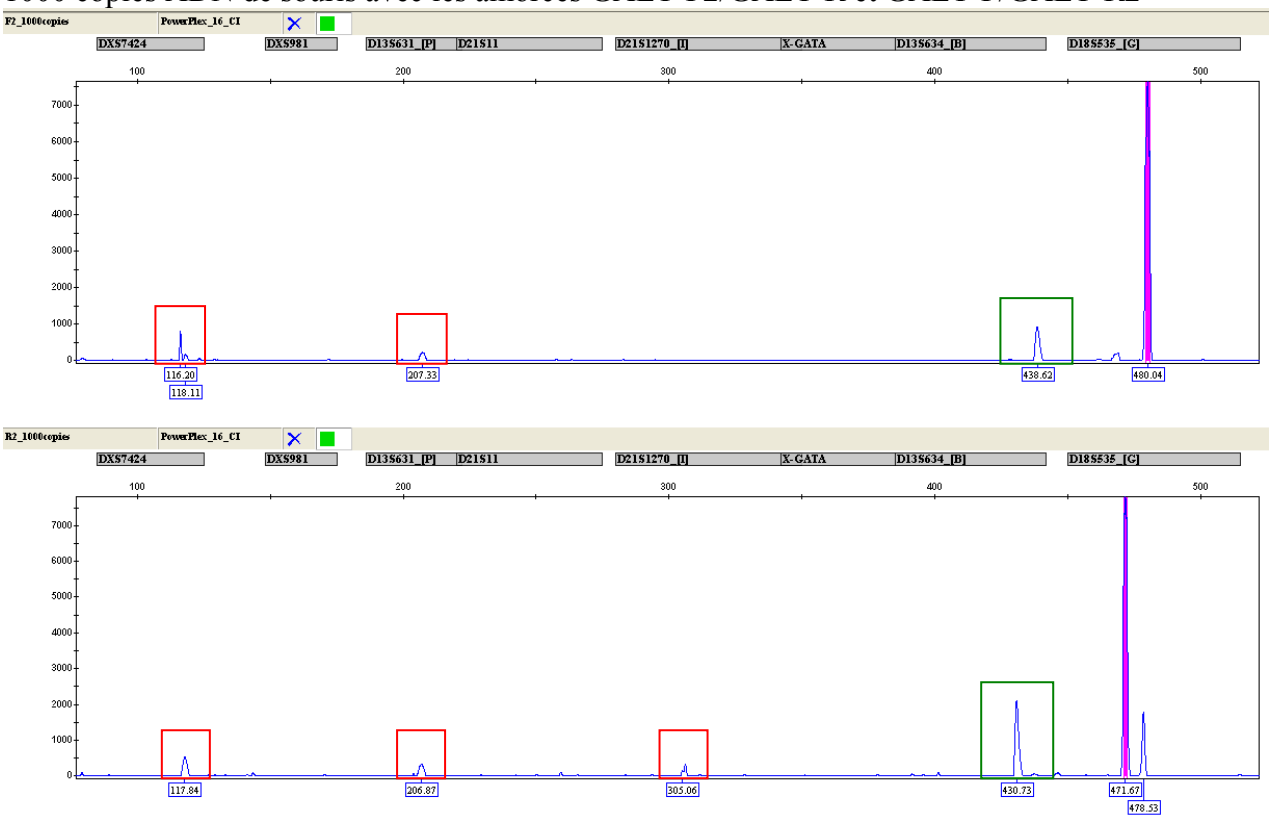
Nous allons faire plusieurs PCR avec différentes quantités d'ADN pour trouver la quantité optimale :

a. tube n°1 : 1 µl d'ADN 10 copies/µl → 10 copies initiales
b. tube n°2 : 1 µl d'ADN 100copies/µl → 100 copies initiales
c. tube n°3 : 10 µl d'ADN 1000copies/µl → 1000 copies initiales

Choix pour tester le contrôle inhibition seul : **Programme MiniFiler 30 cycles**.

6.3.1.3 Résultats

1000 copies ADN de souris avec les amorces GALT-F2/GALT-R et GALT-F/GALT-R2



100 copies ADN de souris avec les amorces GALT-F2/GALT-R et GALT-F/GALT-R2

10 copies ADN de souris avec les amorces GALT-F2/GALT-R et GALT-F/GALT-R2

6.3.1.4 Analyse des résultats

Nous obtenons bien des amplifiats pour les amorces GALT-F2/GALT-R et les amorces GALT-F/GALT-R2. Mais, pour les amorces GALT-F/GALT-R2, nous obtenons deux pics, alors que nous n'attendions qu'un seul pic. Le premier se situe à 472 pb et le deuxième, à environ 478 pb. Le pic à 472 pb peut nous gêner dans la lecture des allèles 23 et 24 du marqueur Penta E dans le kit PowerPlex® 16 System. Mais la fréquence de ces allèles est de l'ordre de 0.000 % chez les Caucasiens, chez les Africains et les Hispaniques. Elle se situe entre 0.002-0.010% chez les Asiatiques [Huckenbeck].

Nous remarquons aussi qu'il y a malheureusement des pics supplémentaires. Ces pics supplémentaires peuvent nous déranger lors de la lecture des profils. Avec les deux combinaisons, nous obtenons deux pics se situant aux alentours de 118 pb et 207 pb. Ces derniers sont plus intenses avec les amorces GALT-F/GALT-R2.
Pour les amorces GALT-F/GALT-R2, il y a un troisième pic supplémentaire. Il se situe vers 307 pb.
Ces pics supplémentaires peuvent provenir des restes de colorants qui n'ont pas été éliminés lors de la purification des amorces. Il aurait peut-être fallu demander une meilleure purification lors de leur achat ou diminuer la concentration des amorces GALT-F2/GALT-R et GALT-F/GALT-R2.

Dans l'essai avec 1000 copies d'ADN de souris initiales, nous notons la présence d'un pic équidistant (encadré en vert) de 41 pb de moins que le pic principal que nous devons obtenir. Ce pic est un artéfact lié à l'excès d'ADN lors de la PCR.

Au bilan, nous pensons que la quantité initiale optimale d'ADN de souris est de 100 copies. Cette quantité nous donne un pic bien visible comparé à 10 copies d'ADN et sans les excès obtenus avec 1000 copies d'ADN, c'est-à-dire les pics saturant le détecteur (overflow) et l'apparition de pics artéfacts à 430 pb.

6.3.2 Deuxième essai: diminution des pics supplémentaires et insertion du contrôle d'inhibition dans un kit avec un ADN connu.

6.3.2.1 But

Nous voulons diluer les amorces GALT-F2 et GALT-R2 pour en diminuer la concentration à 0.1 µM au lieu de 0.5 µM et ainsi diminuer la hauteur des pics supplémentaires.

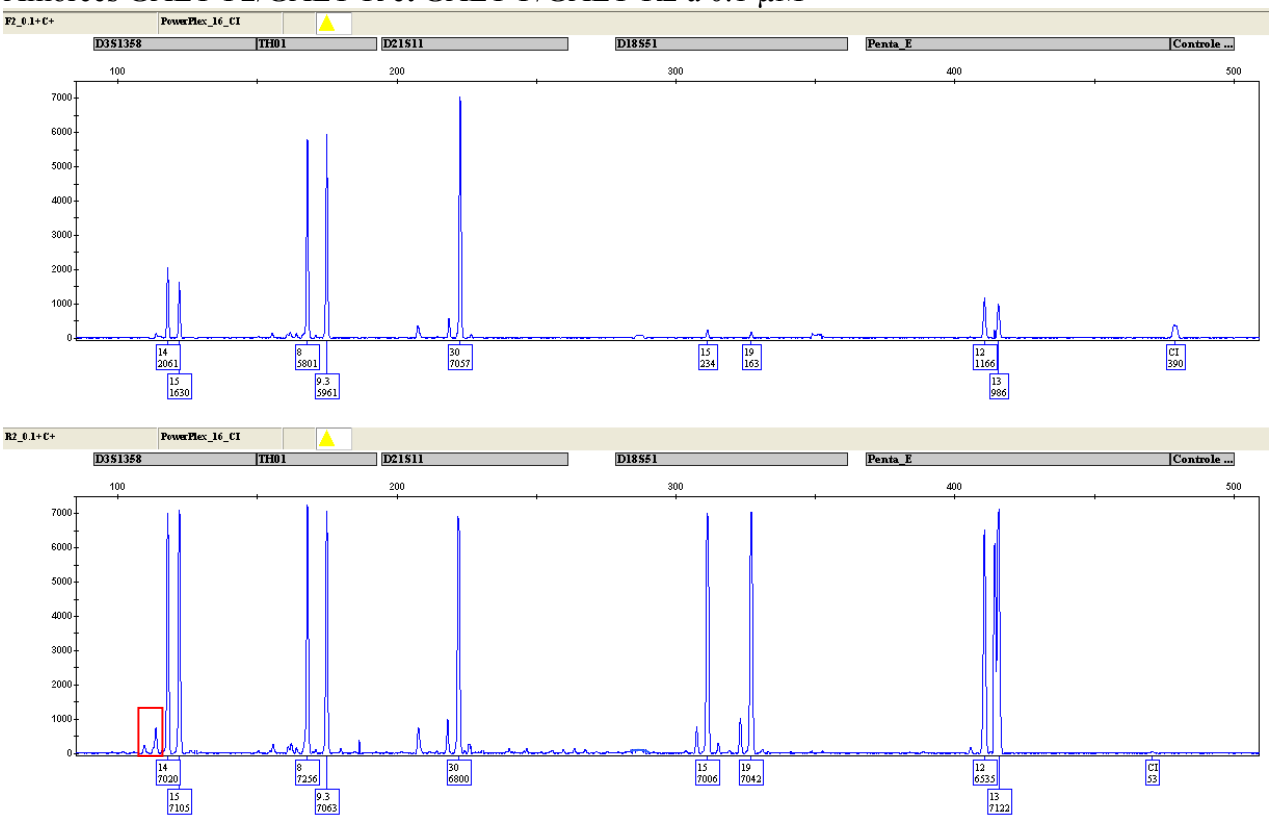
En parallèle, nous voulons vérifier si le CI ne perturbe pas le bon fonctionnement du kit PowerPlex® 16 System, en présence d'un ADN connu préalablement dilué (contrôle positif 9947A DNA (10 ng/µl) du kit).

6.3.2.2 Méthode

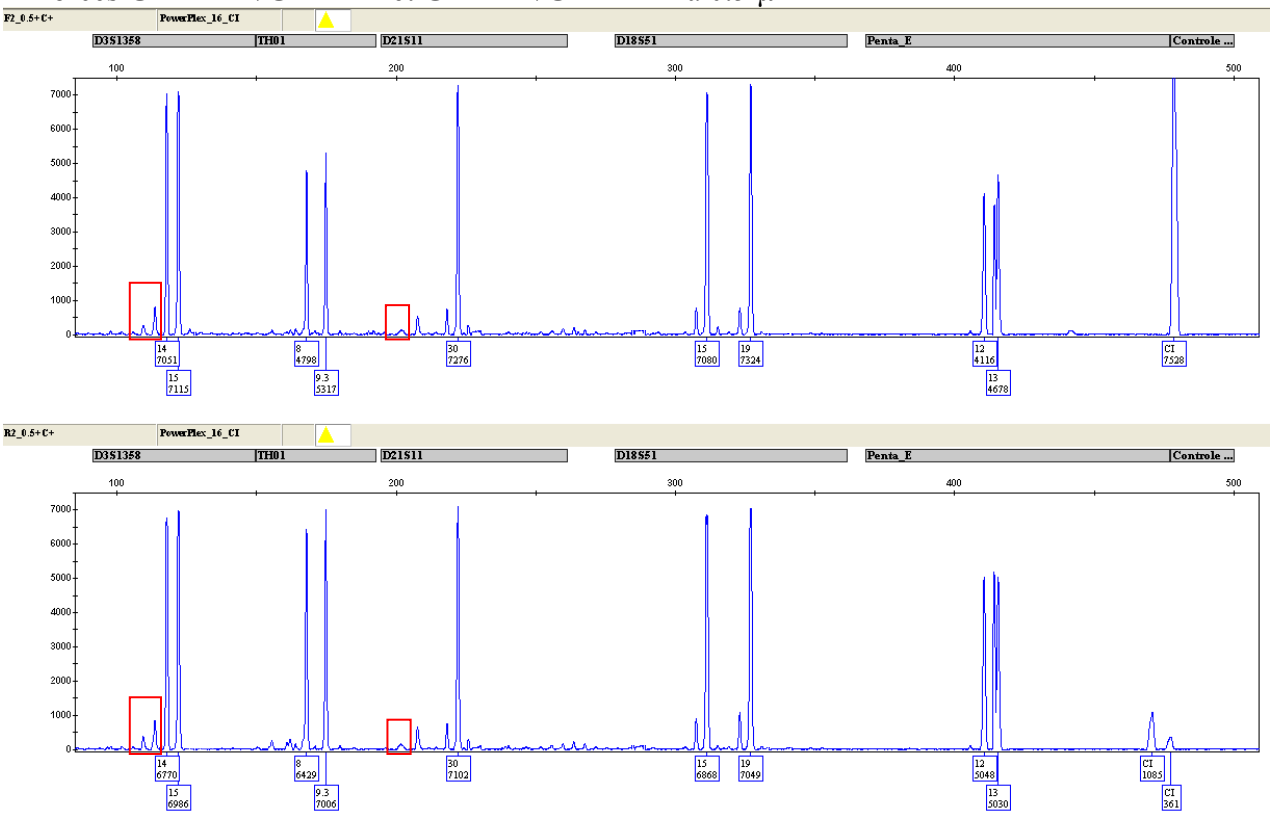
Amplification selon le protocole du kit PowerPlex® System 16, avec 1 ng d'ADN 9947A, 100 copies d'ADN de souris et une concentration des amorces GALT de 0.1 µM respectivement 0.5 µM.

6.3.2.3 Résultats

Amorces GALT-F2/GALT-R et GALT-F/GALT-R2 à 0.1 µM



Amorces GALT-F2/GALT-R et GALT-F/GALT-R2 à 0.5 µM



6.3.2.4 Analyse des résultats

Sur notre profil, nous retrouvons sur les étiquettes des allèles: en premier le nom de l'allèle et en dessous la hauteur des pics.

Le profil que nous devons obtenir pour le contrôle positif 9947A DNA avec le fluorochrome fluorescéine (FL^{TM}) est le suivant [Promega, p.50]:

D3S1358:	14, 15
TH01:	8, 9.3
D21S11:	30, 30
D18S51:	15, 19
Penta E:	12, 13

Tous les pics du contrôle positif 9947A DNA sont bien présents. Cela signifie que le contrôle d'inhibition (CI) n'interfère pas avec la PCR du kit ce qui est une bonne chose.

Les pics de l'ADN de souris se retrouvent bien à l'endroit où ils devraient se trouver. C'est-à-dire à environ 480 pb pour les amorces GALT-F2/GALT-R et à environ 470 pb pour les amorces GALT-F/GALT-R2. Nous retrouvons grosso modo l'efficacité de l'expérience précédente.

Nous pouvons constater que les pics supplémentaires encadrés en rouge ne sont plus présents avec autant d'intensité dans le profil avec la concentration en amorces à 0.1 μM. Sauf, peut-être le pic se situant à environ 118 pb, car il se trouve sous le stutter de l'allèle 14.

Par contre, nous pouvons constater une différence frappante entre la hauteur du pic CI obtenue avec la concentration en amorces de 0.1 μM et le résultat obtenu avec la plus grande concentration. Ceci s'explique par la quantité initiale en amorces qui est plus faible pour le premier profil.

Par conséquent, nous avons testé de nouveau les amorces GALT-F2/GALT-R avec différentes concentrations (0.25 μM et 0.5 μM).

Nous avons décidé d'abandonner les amorces GALT-F/GALT-R2, car elles ne s'amplifient pas comme souhaité. Premièrement, notre but est de n'obtenir qu'un seul pic pour notre CI. Avec ces amorces, nous en obtenons deux, sans que nous ayons pu trouver d'explication à cet état de fait. Deuxièmement, le pic obtenu pour notre CI peut nous déranger dans la lecture des allèles pour le marqueur Penta E. Mais encore, la différence de hauteur obtenue entre la première expérience et la deuxième est flagrante, ce qui laisse envisager des potentielles interférences entre l'amplification avec ces amorces et l'amplification des marqueurs du kit.

6.3.3 Troisième essai: utilisation d'un mélange prêt à l'emploi d'ADN de souris et des amorces correspondantes, et recherche de la concentration optimale.

6.3.3.1 But

Tout d'abord, nous avons dilué les amorces GALT-F2 et GALT-R pour en obtenir la concentration de 0.25 µM, au lieu de 0.5 µM et ainsi réessayer de diminuer la hauteur des pics supplémentaires.

Ensuite, nous avons préparé un mélange d'ADN de souris et d'amorces (CIMIX 12.5) pour ne plus avoir qu'à rajouter un microlitre de ce mélange dans le MasterMix du kit utilisé. Ce mélange CIMIX contient en outre un stabilisateur : le tRNA.

Nous avons effectué le test avec le kit AmpFlSTR® SGM Plus™.

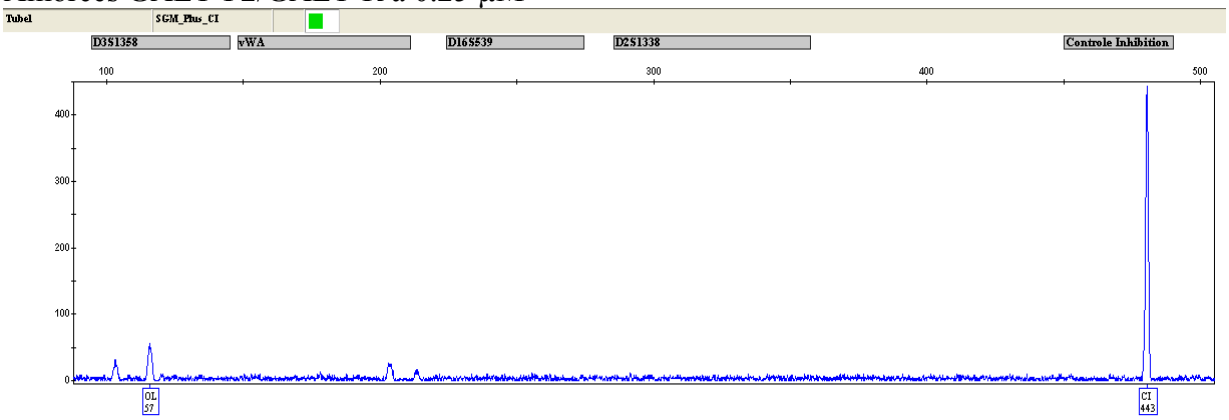
6.3.3.2 Méthode

Amplification selon le protocole du kit AmpFlSTR® SGM Plus™ avec 1 µl de CIMIX 12.5 par réaction. Ceci fournit 100 copies d'ADN de souris et une concentration des amorces de 0.25 µM respectivement 0.5 µM suivant le CIMIX utilisé.

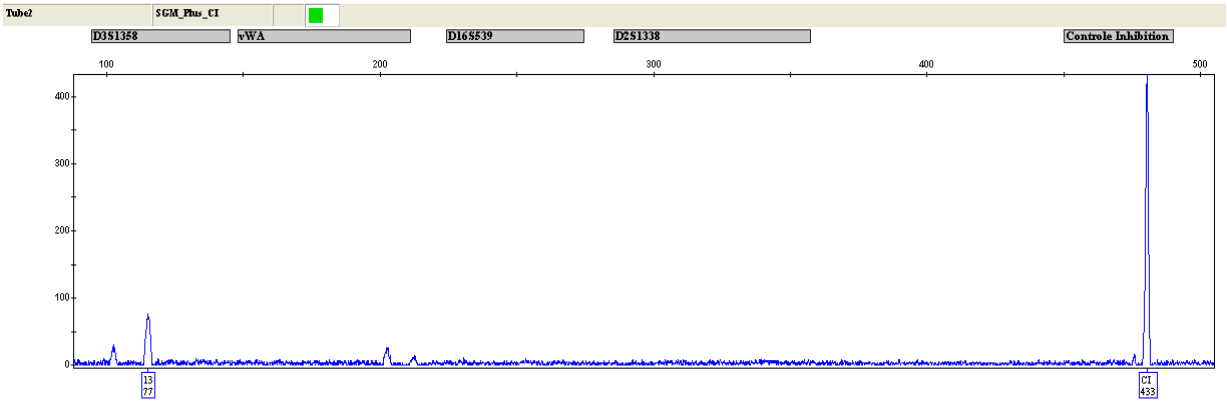
CIMIX 12.5 (0.25 µM d'amorces):	*CIMIX 12.5* (0.5 µM d'amorces):
2.6 µl tRNA 100 ng/µl	12.4 µl tRNA 100 ng/µl
3.2 µl amorce GALT-F2 1 µM	1 µl amorce GALT-F2 10 µM
3.2 µl amorce GALT-R 1 µM	1 µl amorce GALT-R 10 µM
1 µl ADN souris 1000 copies/µl	1.6 µl ADN souris 1000 copies/µl

6.3.3.3 Résultats

Amorces GALT-F2/GALT-R à 0.25 µM



Amorces GALT-F2/GALT-R à 0.5 µM



6.3.3.4 Analyse des résultats

L'amplification s'est correctement déroulée pour les deux tests. Certes, la hauteur de notre CI est plus petite que sur le premier essai. Mais, il faut tenir compte que dans le premier essai, nous avons effectué une PCR de 32 cycles, tandis que pour le kit AmpFlSTR® SGM Plus™, nous effectuons une PCR de 28 cycles. Par conséquent, nous avons 2^4, c'est-à-dire 16 fois moins d'ADN en supposant bien sûr que l'amplification s'est déroulée de manière exponentielle.

Sur la deuxième fenêtre, nous obtenons justement ce que nous voulons éviter. C'est-à-dire que le pic supplémentaire soit nommé comme un allèle (ici, allèle 13), alors que cela n'en est pas un. Certes, pour une personne ayant de l'expérience, nous pouvons aisément différencier un pic d'un allèle et un pic artéfact, grâce à la forme de celui-ci. La pointe du pic artéfact a une forme plus arrondie, par contre, le vrai pic se termine en pointe plus fine.

Malgré, une concentration plus faible en amorces dans la première fenêtre, nous n'avons constaté qu'une faible diminution de la hauteur des pics supplémentaires. Cependant, l'amplification du CI est quasiment identique avec les deux concentrations.

Par conséquent, nous avons décidé de garder la concentration des amorces à 0.25 µM.

6.3.4 Quatrième essai : Essai du mélange prêt à l'emploi CIMIX avec différents kits.

6.3.4.1 But

Premièrement, nous avons préparé un mélange d'ADN de souris et d'amorces (CIMIX 10), similaire au mélange CIMIX 12.5 utilisé au chapitre 6.3.3, mais adapté pour les kits travaillant avec un volume réactionnel de 10 µl, c'est-à-dire les kits AmpFlSTR® MiniFiler™, AmpFlSTR® Yfiler™.

Ensuite, nous avons inséré le mélange CIMIX 12.5 ou CIMIX 10 selon le volume final de la PCR dans les kits suivants : AmpFlSTR® SGM Plus™, AmpFlSTR® MiniFiler™, AmpFlSTR® Yfiler™ pour vérifier si notre CI n'altère pas la qualité des résultats de ces kits avec deux contrôles positifs :

- Control DNA 9947A (1 ng/µl) pour les kits AmpFlSTR® SGM Plus™ et AmpFlSTR® MiniFiler™
- et AmpFlSTR® Control DNA 007 (0.10 ng/µl) pour le kit AmpFlSTR® Yfiler™.

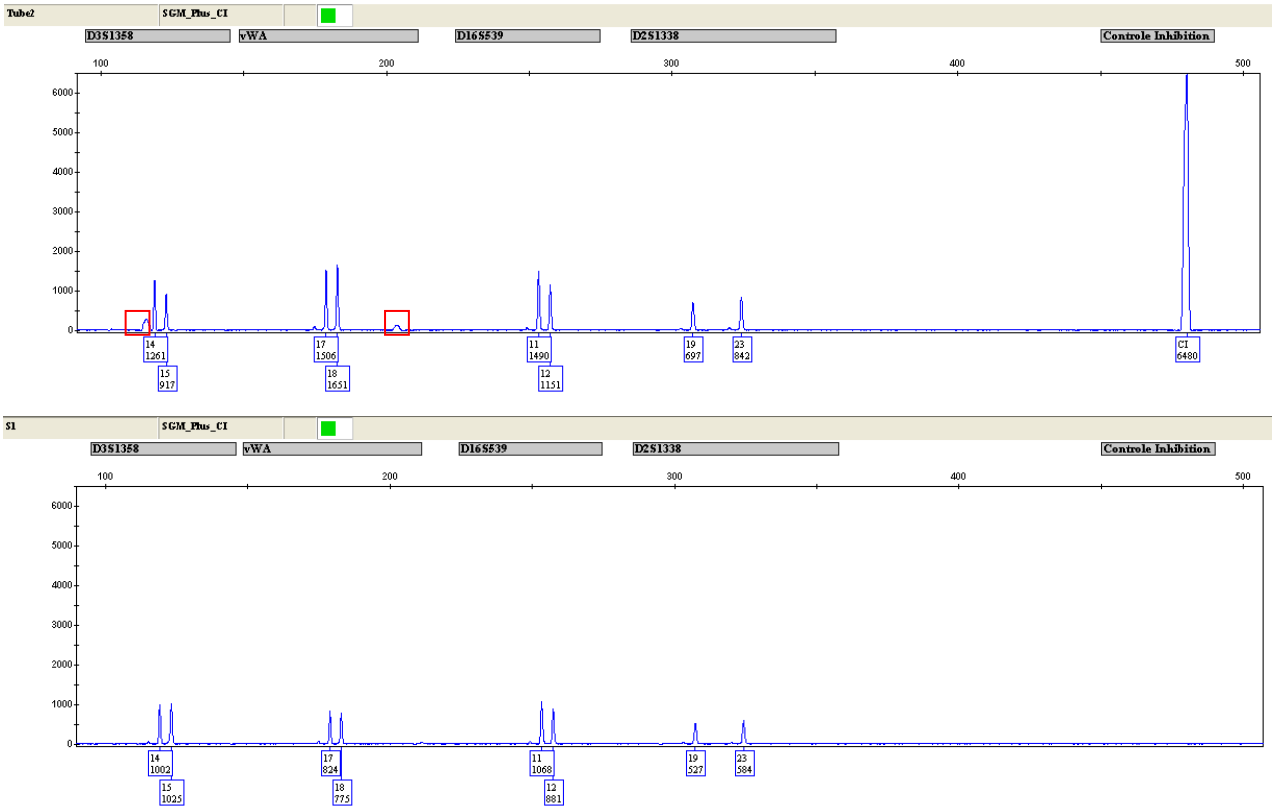
6.3.4.2 Méthode

Amplification selon les protocoles de chaque kit, avec 1 µl de CIMIX 10 par réaction et 0.5 ng d'ADN contrôle positif. Pour le kit AmpFlSTR® SGM Plus™, c'est 1 µl de CIMIX 12.5 qui a été utilisé, et un supplément d'ADN de souris a été ajouté pour arriver à 1000 copies.

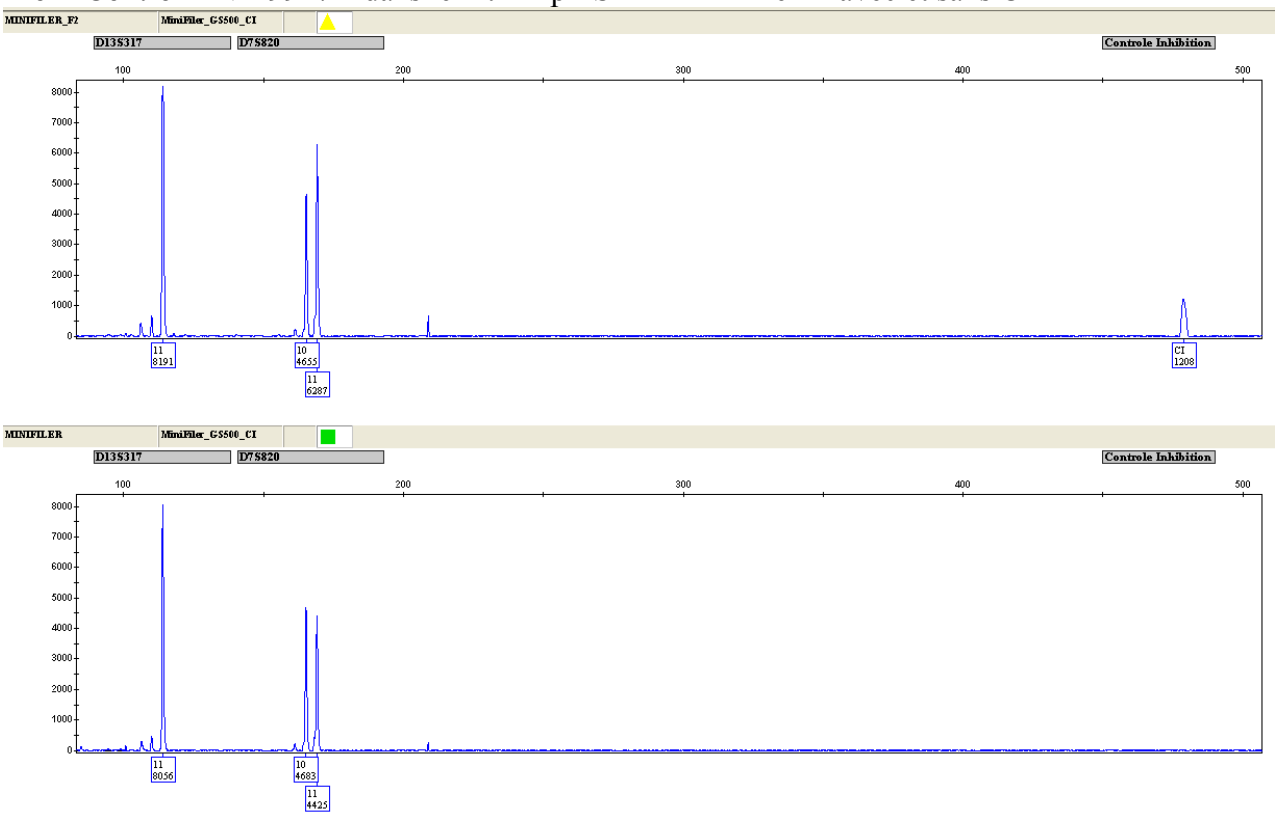
CIMIX 10 (0.25 µM d'amorces):
10 µl ADN de souris 1000 copies/µl
2.5 µl amorce GALT-F2 100 µM
2.5 µl amorce GALT-R 100 µM
85 µl tRNA 100 ng/µl

6.3.4.3 Résultats

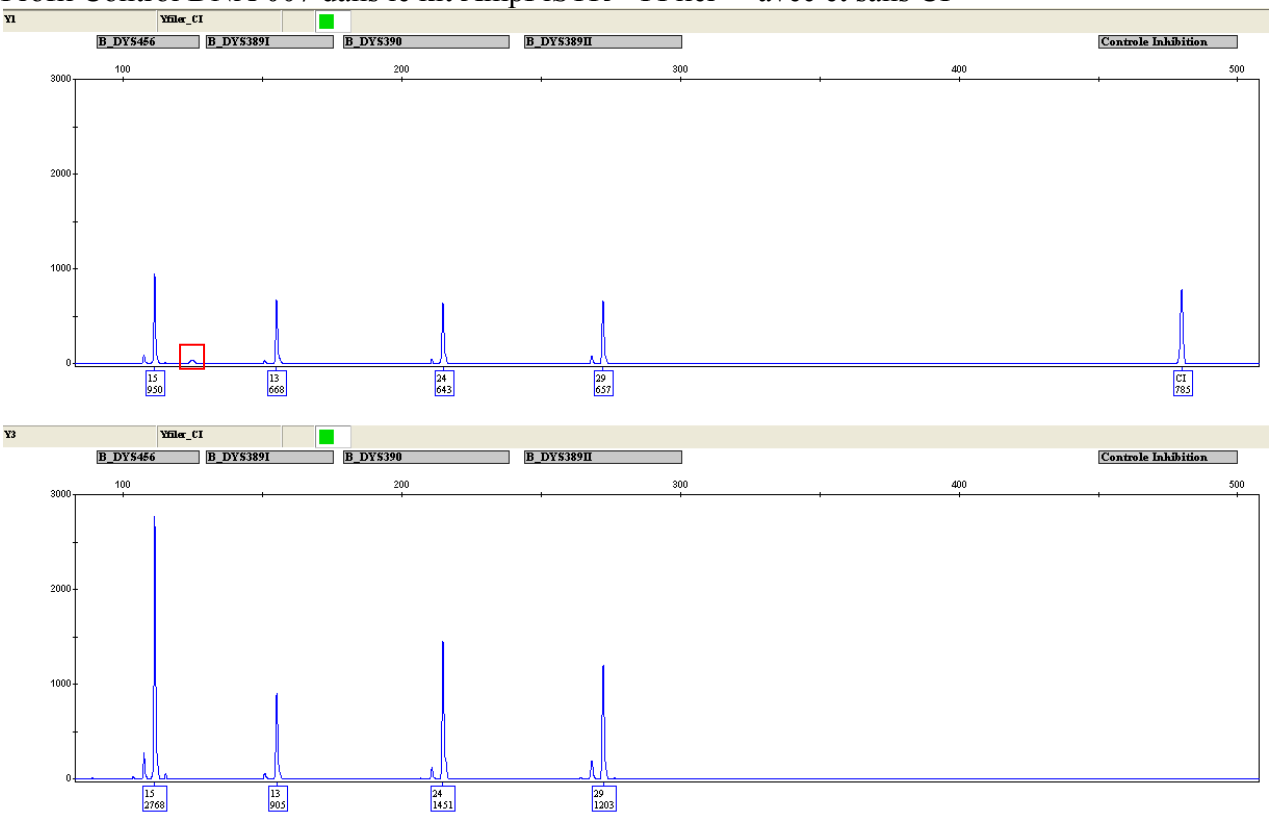
Profil Control DNA 9947A dans le kit AmpFlSTR® SGM Plus™ avec et sans CI



Profil Control DNA 9947A dans le kit AmpFlSTR® MiniFiler™ avec et sans CI



Profil Control DNA 007 dans le kit AmpFlSTR® YFiler™ avec et sans CI



6.3.4.4 Analyse des résultats

Notre CI est bien présent et nous obtenons les profils désirés des contrôles positifs DNA 9947A ou DNA 007 pour chaque kit. Donc, il ne perturbe pas le bon fonctionnement des PCR. Sauf, peut-être pour le kit AmpFlSTR® YFiler™. Il semble que l'amplification se soit moins bien déroulée pour les STR de faible poids moléculaire en présence du CI. Toutefois, le profil est plus homogène, les pics obtenus se situent tous à la même hauteur.

Pour le kit AmpFlSTR® SGM Plus™, nous avons décidé d'augmenter la quantité initiale d'ADN de souris à 1000 copies, pour augmenter les chances de détecter une interférence avec l'amplification des marqueurs des kits. Néanmoins, aucune interférence n'a été détectée.

Par contre, nous sommes toujours embêtés par la hauteur des pics supplémentaires des colorants encadrés en rouge, car ils se retrouvent sur les allèles des marqueurs D3S1358 et D21S11 pour le kit PowerPlex® 16 System, D3S1358 et vWA pour le kit AmpFlSTR® SGM Plus™, D13S317 pour le kit AmpFlSTR® MiniFiler™ et DYS456 et DYS390 pour le kit AmpFlSTR® Yfiler™. Ils peuvent soit masquer la présence de ces allèles surtout si la quantité d'ADN de l'extrait de l'échantillon est faible et la hauteur des pics supplémentaires est grande, soit être confondus avec les allèles. Mais, nous pouvons rien y faire à part tenter d'obtenir des amorces plus pures lors de la prochaine commande.

6.3.5 Cinquième essai: inhibition de la Taq Polymérase dans les différents kits avec de l'hémoglobine.

6.3.5.1 But

Nous voulons essayer d'inhiber l'AmpliTaq Gold® DNA polymerase (5U/µl) avec de l'hémoglobine (chapitre 6.1.5.2) pour vérifier la réaction du CI.

Et, nous allons utiliser un ADN extrait d'un échantillon de sang (chapitre 6.1.5.2) dans les kits PowerPlex® 16 System, AmpFlSTR® SGM Plus™, AmpFlSTR® MiniFiler™ et AmpFlSTR® YFiler™.

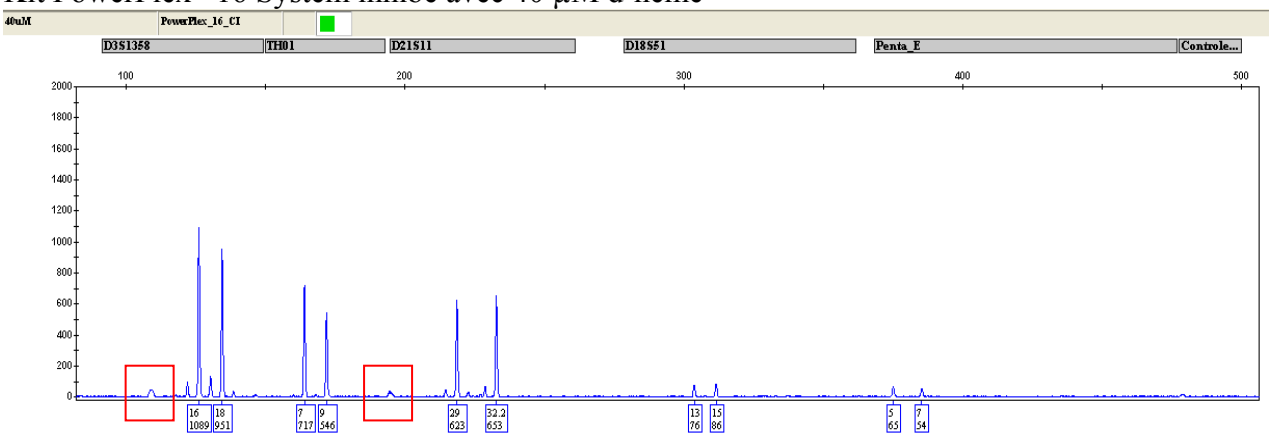
6.3.5.2 Méthode

Amplification selon les protocoles de chaque kit, avec 1 µl de CIMIX 10 ou CIMIX 12.5 par réaction (selon le volume réactionnel du kit), 0.5 ng d'ADN d'un patient, et différentes concentrations d'hème.

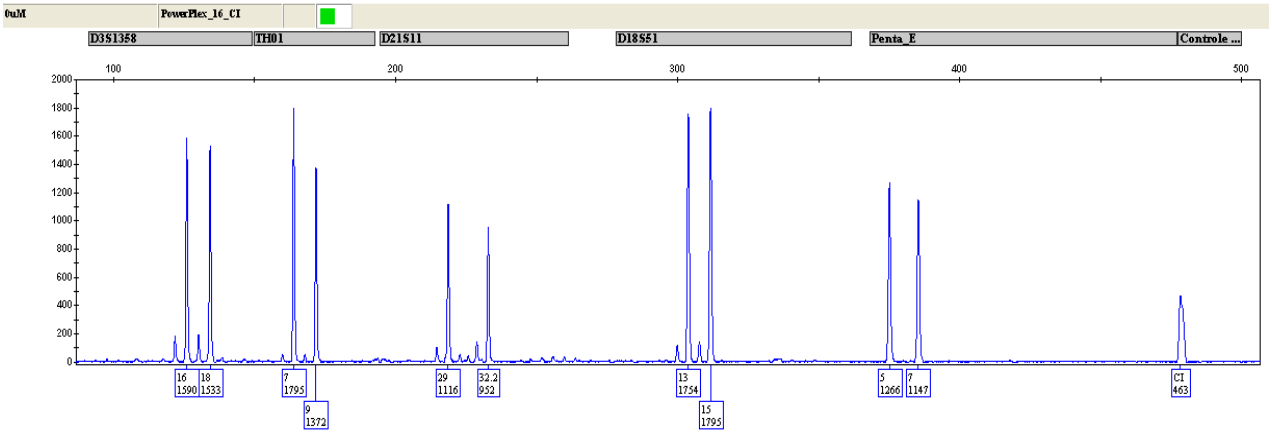
6.3.5.3 Résultats kit PowerPlex® 16 System

Kit PowerPlex® 16 System inhibé avec 200 µM d'hème

Kit PowerPlex® 16 System inhibé avec 40 µM d'hème



Kit PowerPlex® 16 System sans inhibition



6.3.5.4 Analyse des résultats

L'AmpliTaq Gold® DNA polymerase est totalement inhibée avec une concentration de 200 µM d'hème. Il n'y a aucun profil pour le patient, ni aucun pic pour notre CI. Par contre, les pics de colorants sont toujours présents (encadrés en rouge).

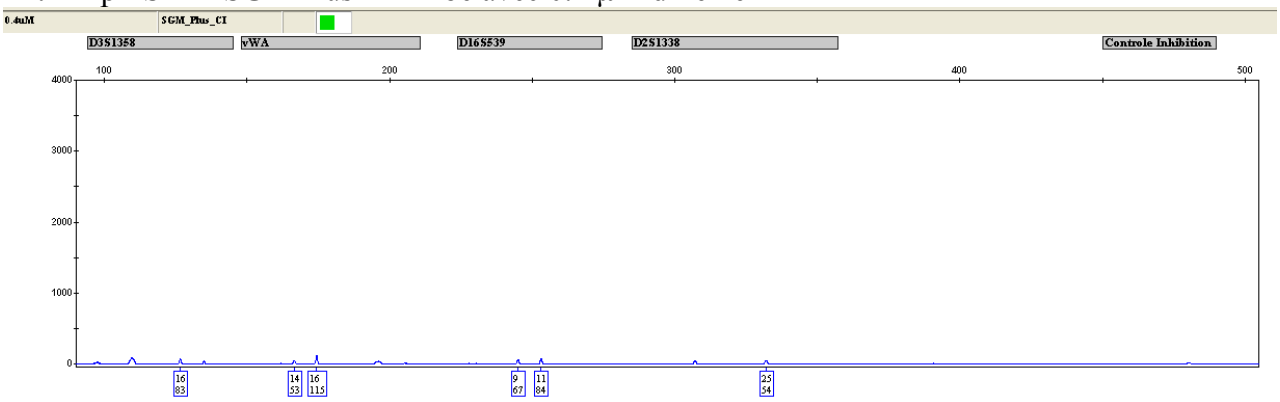
Malgré la présence de beaux pics pour l'extrait d'ADN du patient avec une concentration de 40 µM, nous constatons que notre CI est absent. Ceci nous démontre que notre CI est particulièrement sensible à l'inhibition et que pour l'instant notre CI réagit comme nous le souhaitions.

Maintenant, il nous reste à savoir s'il en va de même pour les kits restants.

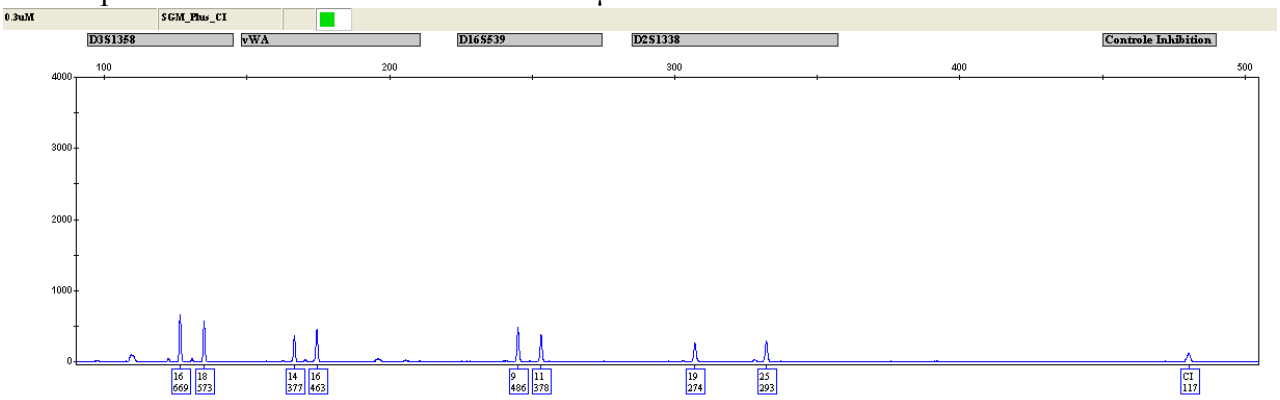
6.3.5.5 Résultats kit AmpFlSTR® SGM Plus™

Kit AmpFlSTR® SGM Plus™ inhibé avec 0.5 µM d'hème

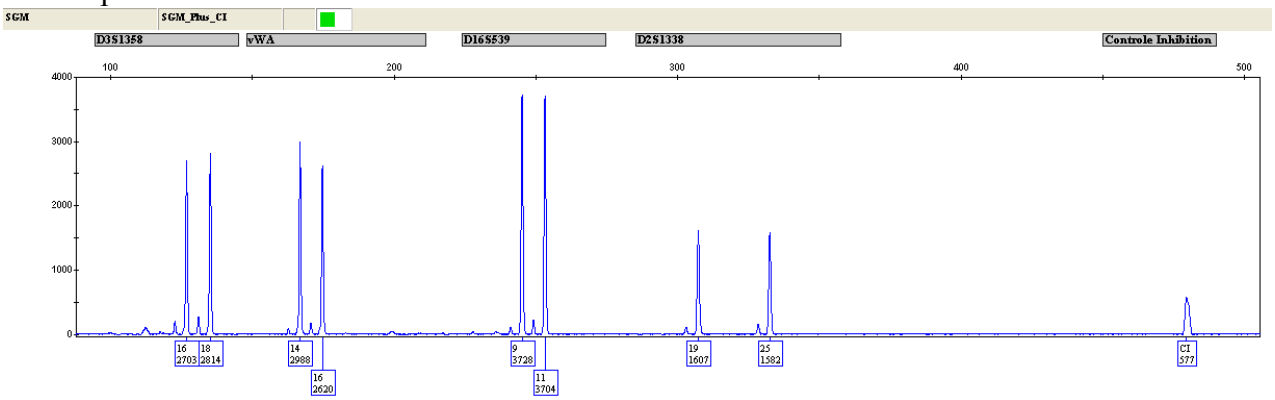
Kit AmpFlSTR® SGM Plus™ inhibé avec 0.4 µM d'hème



Kit AmpFlSTR® SGM Plus™ inhibé avec 0.3 µM d'hème



Kit AmpFlSTR® SGM Plus™ sans inhibition



6.3.5.6 Analyse des résultats

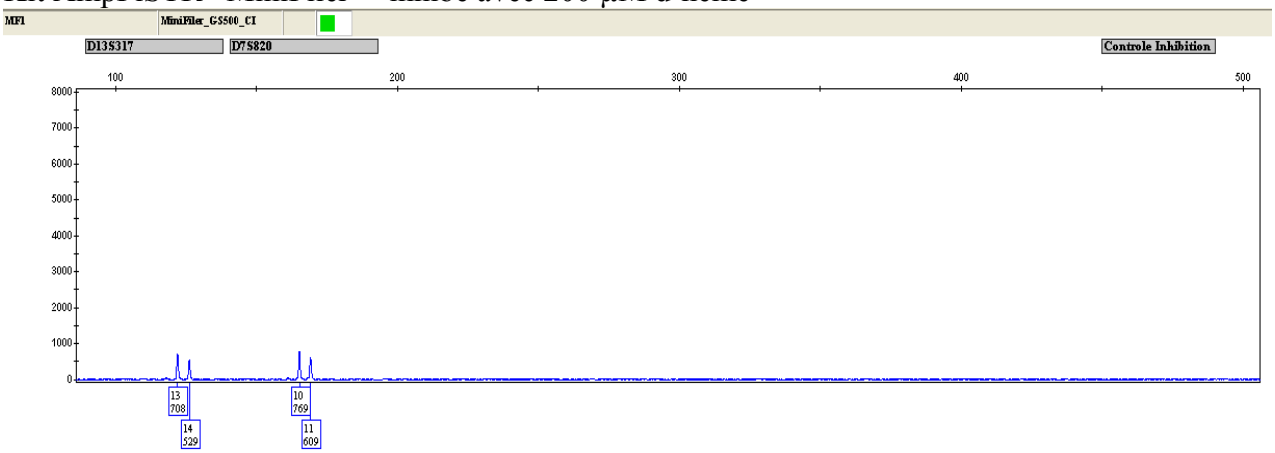
Avec cet essai, nous avons fait une concentration progressive en Hb. Car, il a été difficile de déterminer la concentration qui nous permet d'avoir un profil partiel. Nous constatons que ce kit est extrêmement sensible aux inhibiteurs.

Avec une concentration d'hème de 0.5 µM, nous n'obtenons aucun profil. Puis, progressivement en diminuant la concentration en hème, le profil apparaît, ainsi que notre CI.

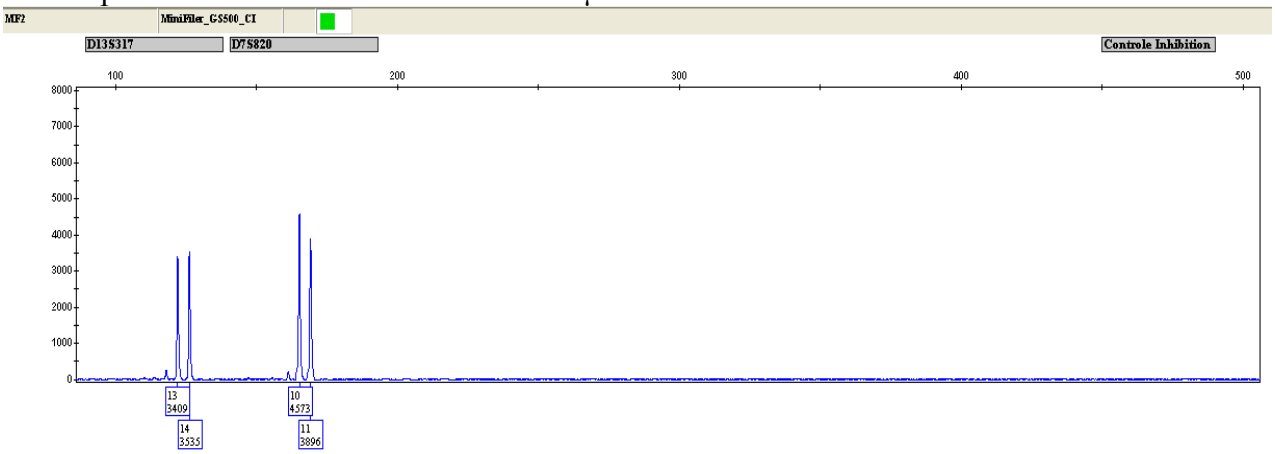
Nous n'obtenons pas la fin du pic du CI pour le test sans inhibition, car le tampon de migration devenait trop vieux. Du coup, la migration devient plus lente et le CI étant de grande taille, n'est pas complètement passé devant la fenêtre optique.

6.3.5.7 Résultats kit AmpFlSTR® MiniFiler™

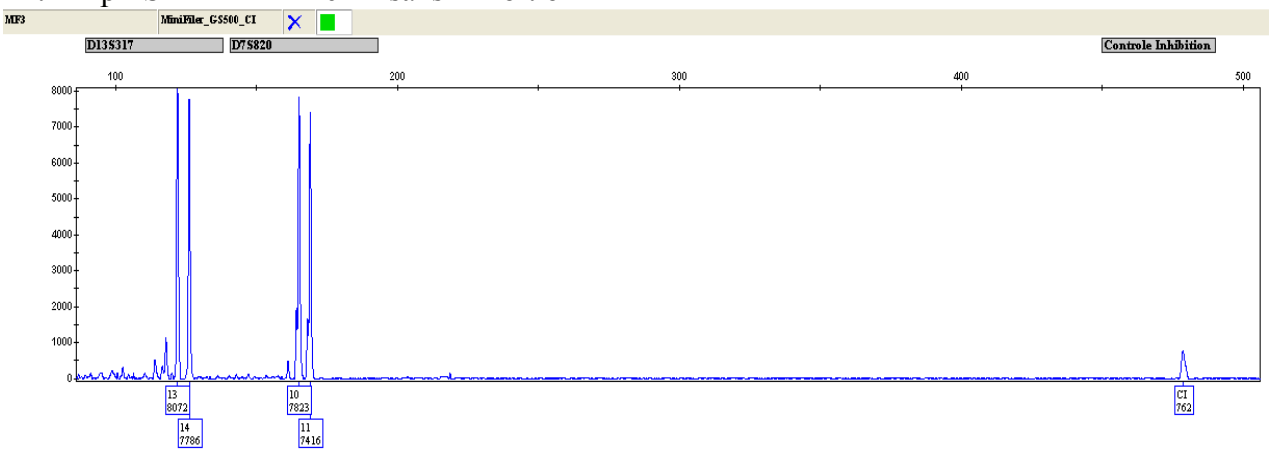
Kit AmpFlSTR® MiniFiler™ inhibé avec 200 µM d'hème



Kit AmpFlSTR® MiniFiler™ inhibé avec 80 µM d'hème



Kit AmpFlSTR® MiniFiler™ sans inhibition



6.3.5.8 Analyse des résultats

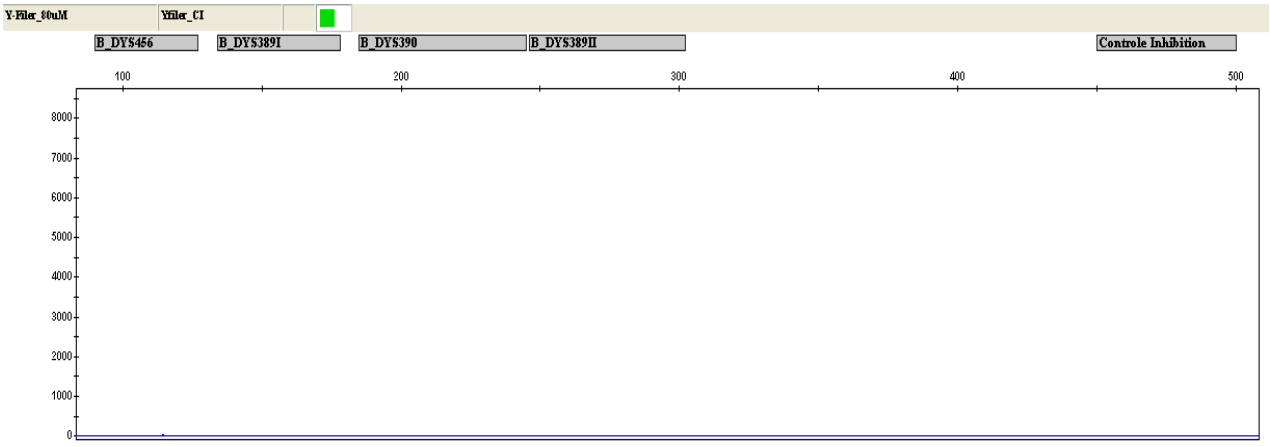
Dans le manuel d'utilisation user guide AmpFlSTR® MiniFiler™ [ch. 5-34 à 5-36], le kit AmpFlSTR® MiniFiler™ a été comparé avec les kits suivants : AmpFlSTR® Identifiler™ et AmpFlSTR® SGM Plus™ d'Applied Biosystems. Les résultats ressemblent à ceux que nous avons obtenus, c'est-à-dire que le kit AmpFlSTR® MiniFiler™ résiste remarquablement bien à la présence d'inhibiteurs.

Avec le kit AmpFlSTR® MiniFiler™, malgré la diminution de la hauteur des pics en fonction de la concentration en hème, nous obtenons un bon profil pour notre patient. Par contre, notre CI joue correctement son rôle. Il est totalement absent avec une concentration de 200 µM et de 80 µM.

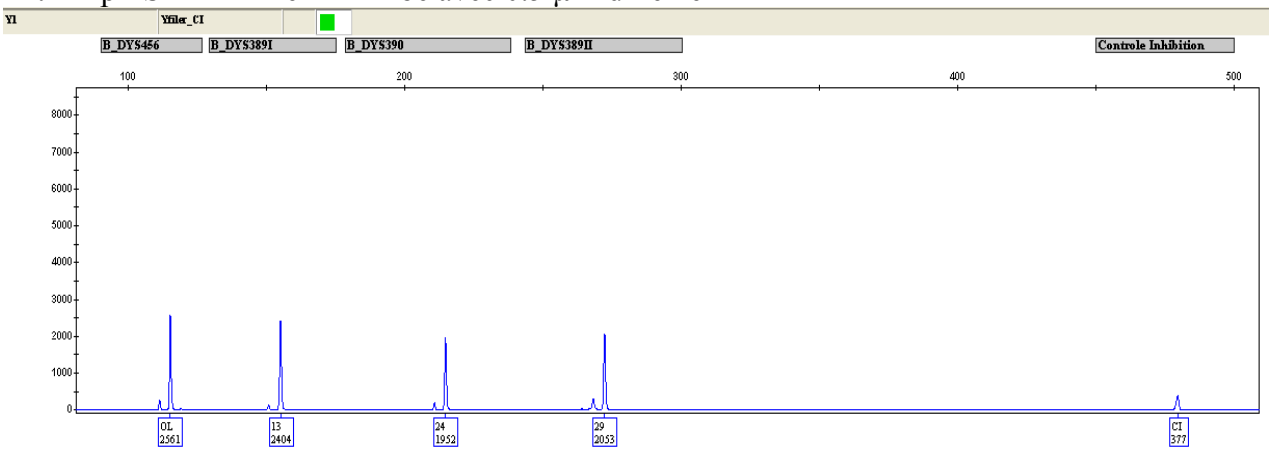
Il est facile de remarquer que ce kit est difficilement inhibé. Nous aurions pu augmenter la concentration en hème en faisant une dilution du sang du patient plus faible, mais cela ne nous intéresse pas, car nous savons d'ores et déjà que ce kit possède une meilleure résistance aux inhibiteurs.

6.3.5.9 Résultats kit AmpFlSTR® YFiler™

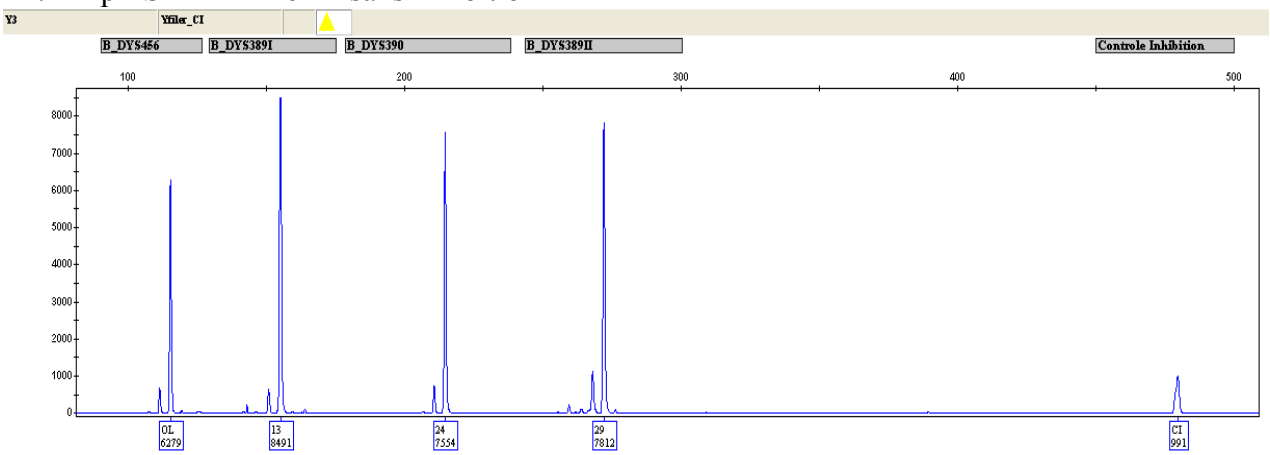
Kit AmpFlSTR® YFiler™ inhibé avec 80 µM d'hème



Kit AmpFlSTR® YFiler™ inhibé avec 0.5 µM d'hème



Kit AmpFlSTR® YFiler™ sans inhibition



6.3.5.10 Analyse des résultats

Tout comme le kit AmpFlSTR® SGM Plus™, le kit AmpFlSTR® YFiler™ est très sensible aux substances inhibitrices. Nous remarquons que le pic du CI est très faible lorsque nous sommes en présence d'une faible quantité d'hème. Par contre, les pics du patient sont bien visibles. Par conséquent, notre CI réagit mieux que ce que nous l'espérions.

6.3.6 Sixième essai: amplification d'une faible concentration d'ADN avec une faible inhibition de la Taq Polymérase dans le kit PowerPlex® 16 System.

6.3.6.1 But

Nous nous sommes demandé comment réagit notre CI, lorsque nous sommes en présence d'une faible concentration d'ADN et d'une faible inhibition dans le kit PowerPlex® 16 System.

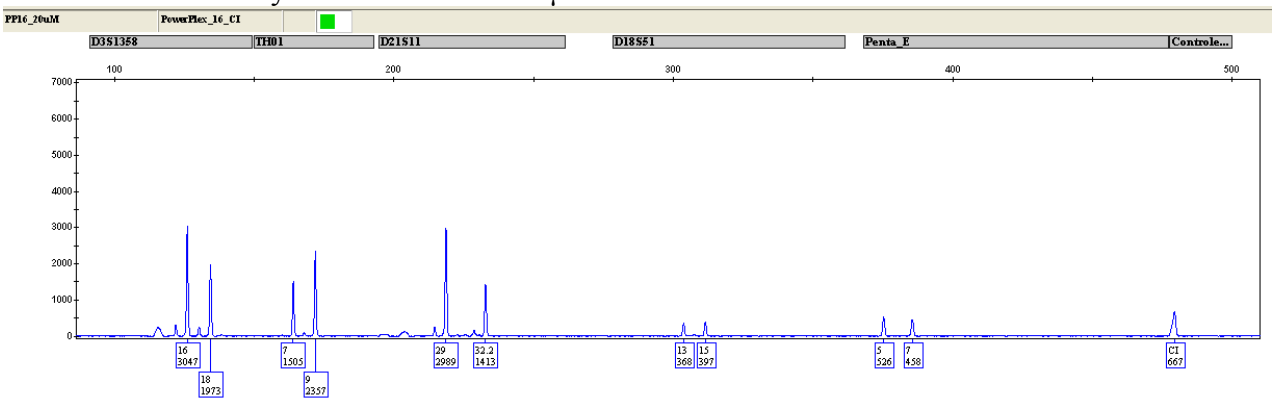
Nous voulons nous assurer que le CI est bien la première cible à être affectée par la présence d'inhibiteurs, même lorsque la quantité d'ADN humain est à la limite de détection.

6.3.6.2 Méthode

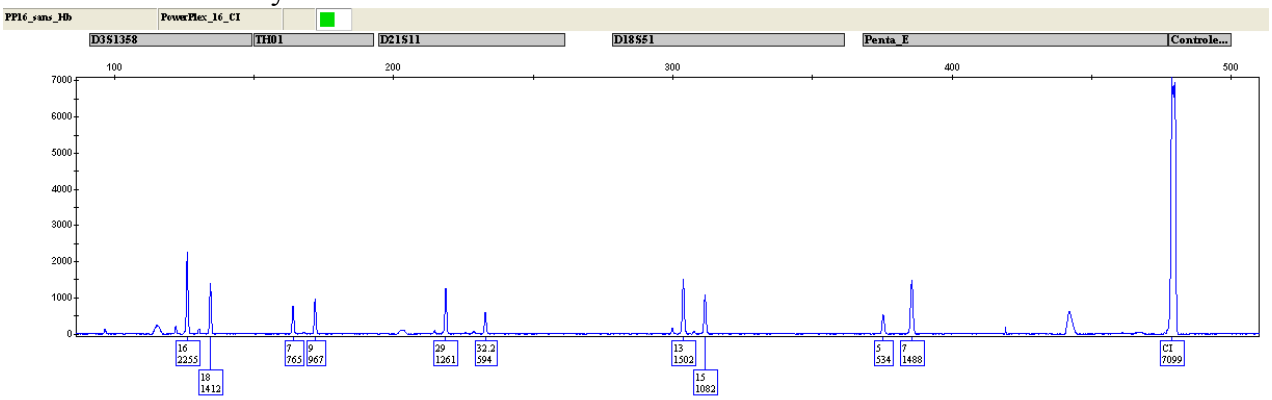
Amplification selon le protocole PowerPlex® 16 System, avec 1 µl de CIMIX 12.5 par réaction, 0.05 ng d'ADN de patient, et 0 ou 25 µM d'hème (chapitre 6.1.5.2).

6.3.6.3 Résultats

Kit PowerPlex® 16 System inhibé avec 20 µM d'hème



Kit PowerPlex® 16 System sans inhibition



6.3.6.4 Analyses des résultats

Il faut savoir que dans une cellule, nous avons 6 pg d'ADN. Ici, avec 0.05 ng d'ADN par réaction, nous sommes initialement en présence de 8 cellules. Et, nous remarquons que nous sommes à la limite de détection, car nous commençons à voir l'effet stochastique. C'est-à-dire les pics ne sont plus équilibrés. Par conséquent, nous sommes bien dans les conditions que nous voulions.

Nous pouvons voir que le CI réagit comme nous nous l'attendions. En présence d'une faible concentration, l'amplification du CI est diminuée par rapport au test sans inhibition. Le CI est donc bien la première cible affectée par un début d'inhibition, même avec des quantités d'ADN humain proches de la limite de détection.

6.3.7 Septième essai: reproductibilité du contrôle d'inhibition.

6.3.7.1 But

Nous avons effectué en parallèle cinq amplifications du CI avec le kit AmpFlSTR® SGM Plus™. Nous voulons savoir si celui-ci s'amplifie de manière reproductible et par la même occasion, savoir à partir de quel seuil nous pouvons parler d'un début d'inhibition.

Nous avons un cas de génétique forensique dans lequel nous devons étudier les STR situés sur le chromosome Y d'une trentaine de personnes. Cette recherche s'effectue à double et par deux techniciennes. C'est pourquoi nous avons décidé d'insérer notre CI dans cette analyse et ainsi pouvoir mesurer la reproductibilité de notre CI. Pour des raisons d'anonymat, nous avons enlevé les noms des patients et nous les avons remplacés par des lettres.

6.3.7.2 Méthode

Pour la partie a), nous avons effectué une amplification selon le protocole AmpFlSTR® SGM Plus™, avec seulement 1 µl de CIMIX 12.5 par réaction.

Pour la partie b), nous avons effectué une amplification selon le protocole AmpFlSTR® YFiler™ (26 cycles) à partir d'un extrait effectué selon la technique d'extraction DNA IQ™ System de Promega, avec 1µl de CIMIX 10 par réaction.

6.3.7.3 Résultats

a) Nous pouvons voir les profils en annexe 2 :

Tubes :	Hauteur des pics :
1	624
2	685
3	696
4	716
5	410

Moyenne:	626
Ecart-type:	126
Coefficient de variation:	20%

b) Nous pouvons voir les profils en annexe 3 :

Tubes, technicienne 1:	Hauteur des pics:
A	260
B	73
C	63
D	186
E	133
F	122
G	169
H	196
I	63
J	152
K	205
L	172
M	153
N	109
O	128
P	156
Q	168
R	195
S	203
T	119
U	250
V	208
W	77
X	106
Y	157
Z	128
AA	106
AB	159
AC	117
AD	115
AE	168
AF	142
AG	158

Moyenne:	149
Ecart-type:	49
Coefficient de variation:	32%

Tubes, technicienne 2:	Hauteur des pics:
A	120
B	102
C	190
D	135
E	155
F	155
G	148
H	163
I	159
J	177
K	147
L	125
M	132
N	166
O	243
P	106
Q	0
R	120
S	106
T	0
U	73
V	107
W	106
X	240
Y	0
Z	145
AA	82
AB	165
AC	139
AD	0
AE	87
AF	145
AG	0

Moyenne:	141
Ecart-type:	41
Coefficient de variation:	29%

Remarque : les chiffres marqués en rouge ne sont pas pris en considération, car ils ont été analysés sur le capillaire n°3 de notre analyseur de fragments, et nous avons eu un petit souci avec ce capillaire.

6.3.7.4 Analyse des résultats

L'essai a) indique une reproductibilité raisonnablement bonne de l'amplification du CI. Imaginons une série similaire d'amplification de divers extraits. Si l'un de ces amplifiats fournissait un pic de hauteur 100 pour le CI, ce serait un bon indice d'une légère inhibition. Si le profil ADN obtenu était un profil partiel, cela justifierait des tentatives d'optimalisation du profil.

Il ne faut pas oublier que pour le test b), nous sommes en présence de vrais patients. Par conséquent, il est possible qu'il y ait de l'inhibition dans certains échantillons, et donc, une mauvaise amplification correspondante du CI. C'est une des possibilités qui peut nous faire obtenir une si grande différence entre les CI des patients.

Il est à noter que la hauteur des pics des CI est relativement basse pour le test b), car le nombre de cycles PCR effectués est de 26 au lieu de 30. Nous effectuons moins de cycles avec un extrait obtenu avec la technique d'extraction DNA IQ™ System, car le rendement est meilleur avec cette extraction. Malgré ce détail, nous observons néanmoins là aussi une reproductibilité raisonnablement bonne de l'amplification du CI.

6.3.8 Huitième essai : utilisation du CI dans l'amplification d'extraits de matériel fixé.

6.3.8.1 But

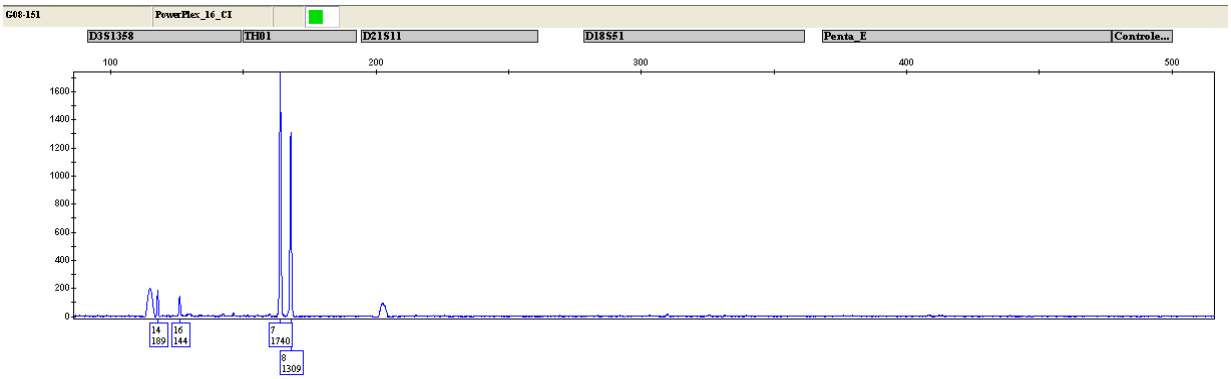
Nous avons cherché des échantillons dont le matériel a été fixé au formol, car souvent nous obtenons un profil partiel. Nous pensons qu'en rajoutant notre CI, il nous permet de savoir si le profil partiel est causé par de l'ADN dégradé ou par de l'inhibition. Nous avons utilisé le kit PowerPlex® 16 System.

6.3.8.2 Méthode

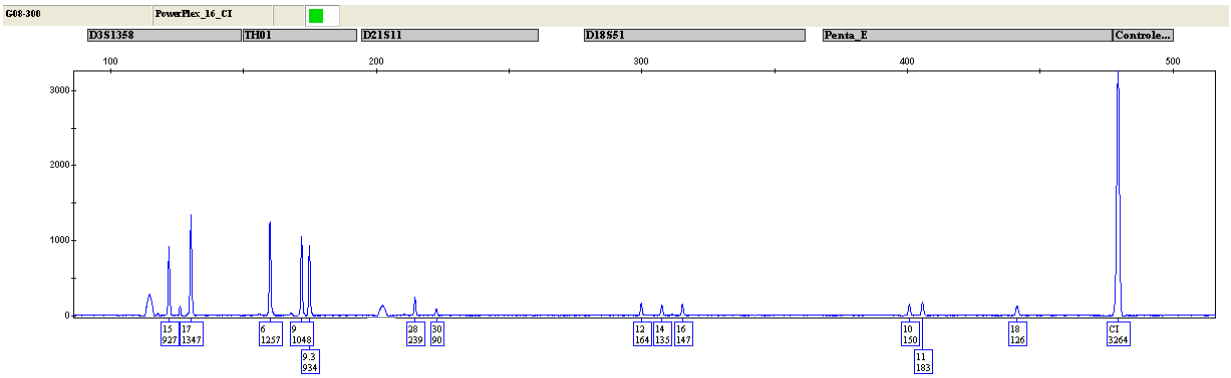
Amplification selon le protocole PowerPlex® 16 System avec 1µl de CIMIX 12.5 par réaction. A noter que la PCR s'est déroulée sur 25 cycles seulement pour les tubes 1 à 4 ; en corollaire, ce sont 1000 copies supplémentaires d'ADN de souris qui ont été ajoutées au MasterMix. Les tubes 4 et 6 sont des contrôles négatifs (sans ADN). Il faut savoir que les extraits des échantillons utilisés sont de qualité connue : les tubes 1 et 3 contiennent des extraits ayant des inhibiteurs et les tubes 2 et 5 de l'ADN dégradé.

6.3.8.3 Résultats

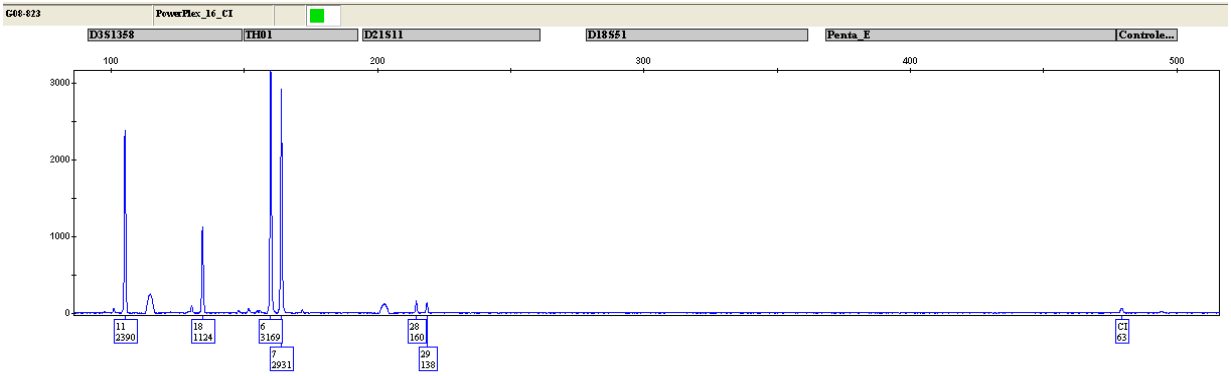
Tube n°1



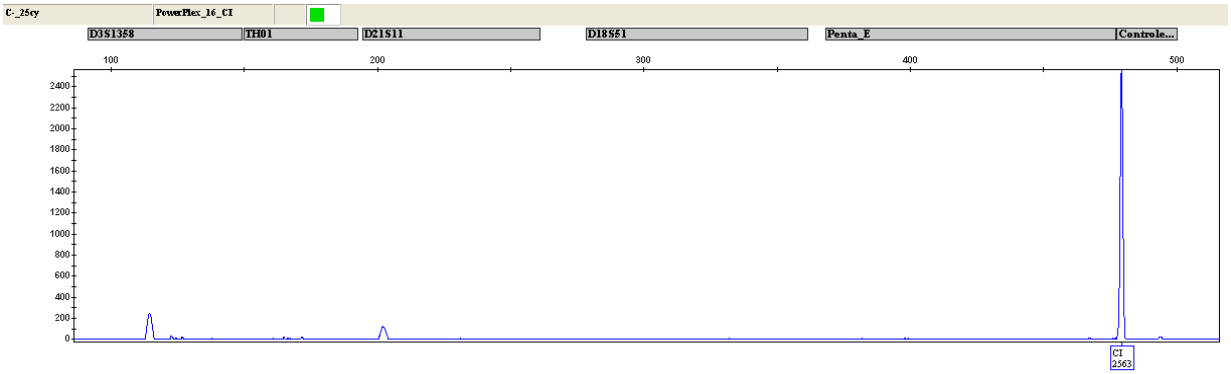
Tube n°2



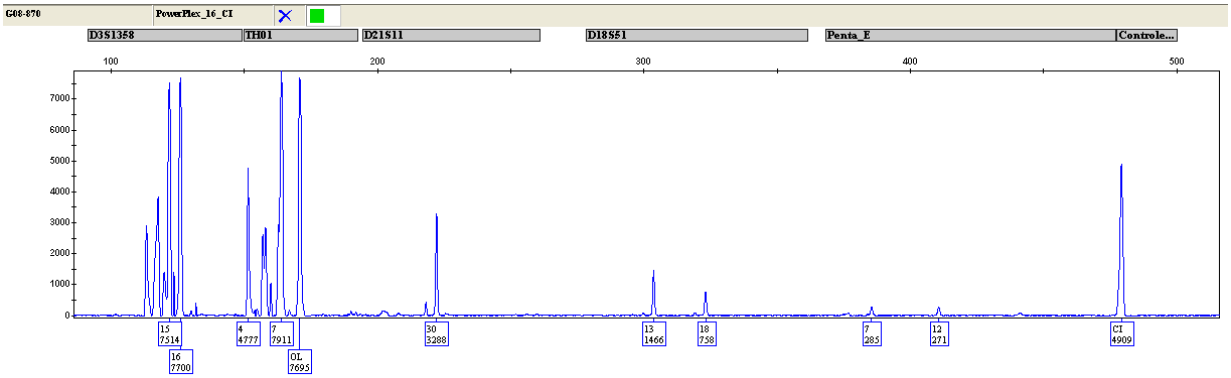
Tube n°3



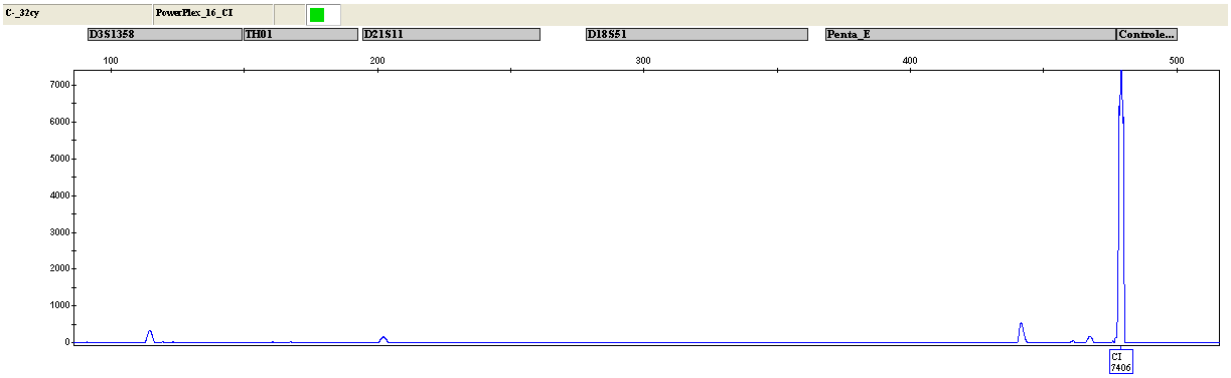
Tube n°4



Tube n°5



Tube n°6



6.3.8.4 Analyse des résultats

Les tubes 4 et 6 (contrôles négatifs) donnent le résultat attendu (présence uniquement du pic CI).
Pour les tubes 1 et 3, le résultat du CI indique que le profil partiel obtenu est bien causé par la présence d'inhibiteurs, car il est faiblement présent ou absent.

Pour les tubes 2 et 5, il n'y a manifestement aucune inhibition, car le CI est bien présent. Donc, le profil partiel obtenu est causé par de l'ADN dégradé.

En résumé, grâce à notre CI nous pouvons bel et bien déterminé si nous sommes en présence d'ADN dégradé ou si le profil partiel obtenu est la conséquence de l'inhibition.

6.3.9 Neuvième essai : insertion du CI dans l'amplification d'extraits de cas réels d'analyse forensique.

6.3.9.1 But

Nous avons inséré notre CI dans des cas réels de génétique dont nous soupçonnons qu'ils contiennent de l'inhibition. Nous avons utilisé le kit AmpFlSTR® SGM Plus™.

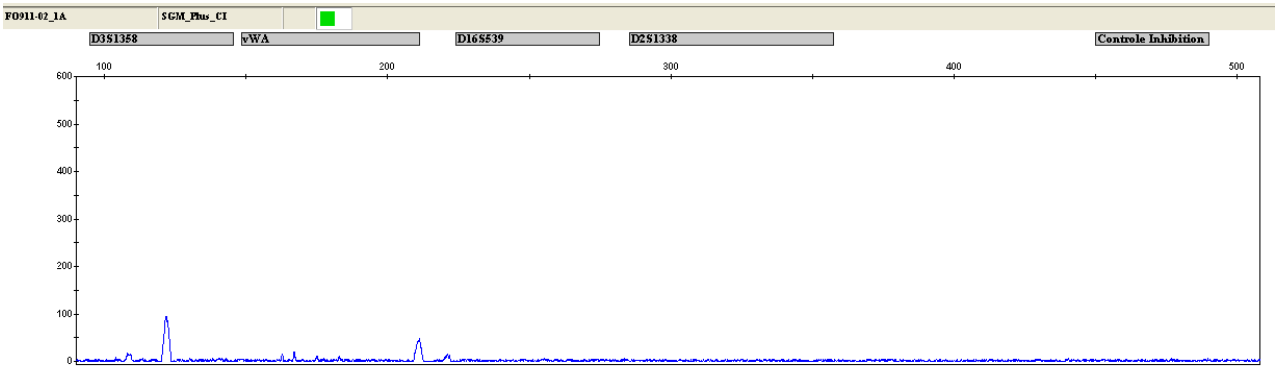
Par la suite, pour les échantillons dont nous n'obtenons aucun profil ou dont le pic CI est absent, nous tentons une deuxième amplification en utilisant une plus faible quantité d'extrait, dans l'espoir d'abaisser la concentration en inhibiteurs en-dessous de la limite produisant encore un effet. Nous avons toujours utilisé le kit AmpFlSTR® SGM Plus™.

6.3.9.2 Méthode

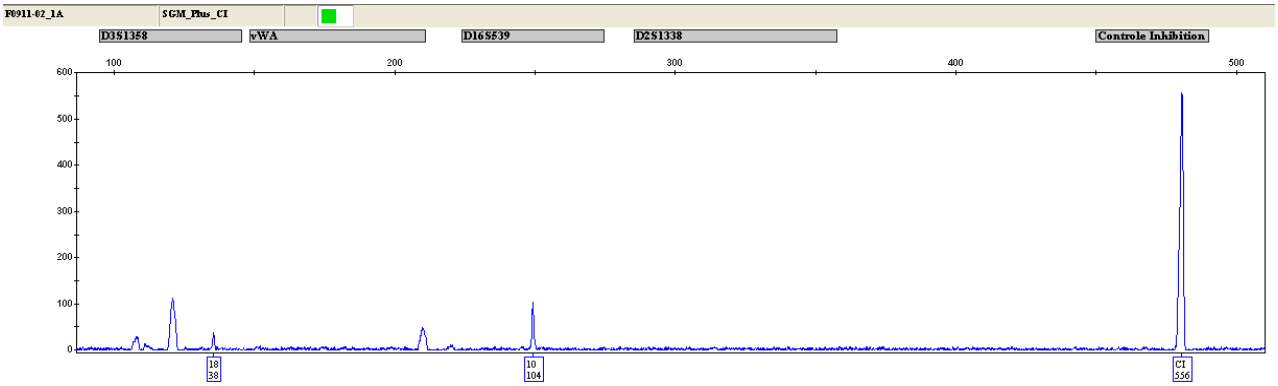
Amplification selon le protocole du kit AmpFlSTR® SGM Plus™ avec 1 µl de CIMIX 12.5 par réaction.

6.3.9.3 Résultats

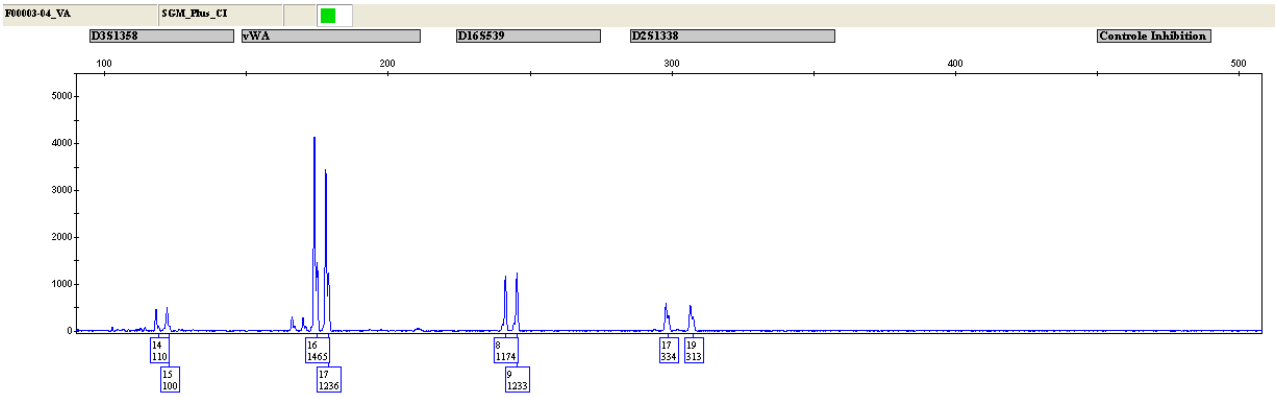
Premier essai :



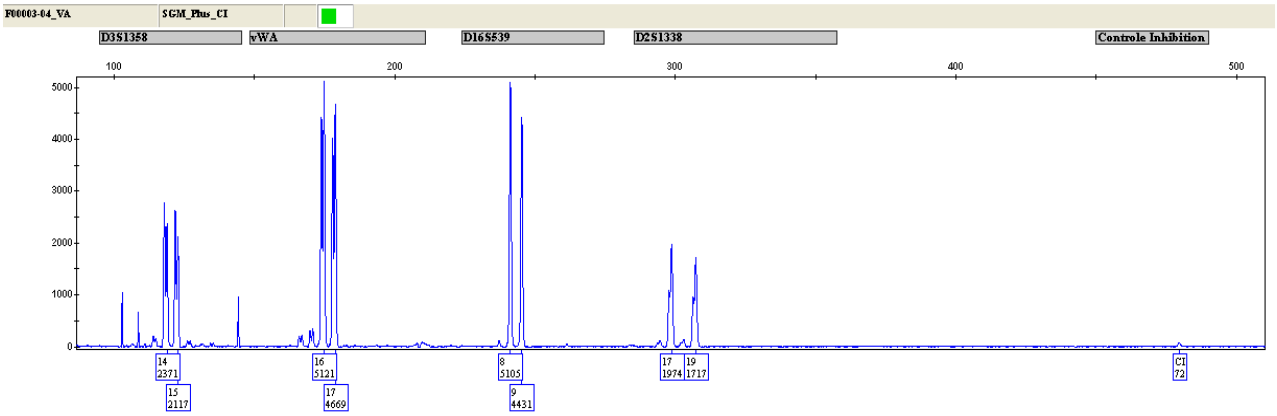
Deuxième essai :



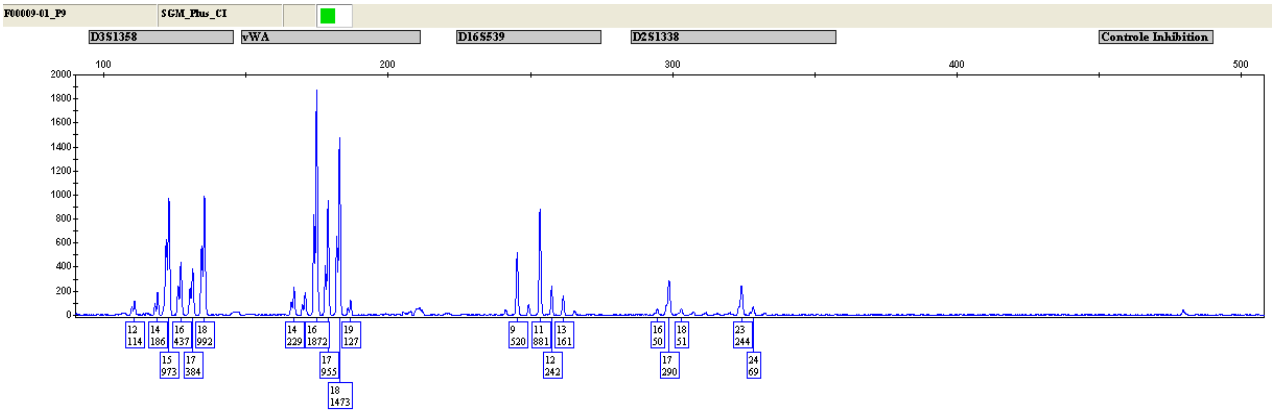
Premier essai :



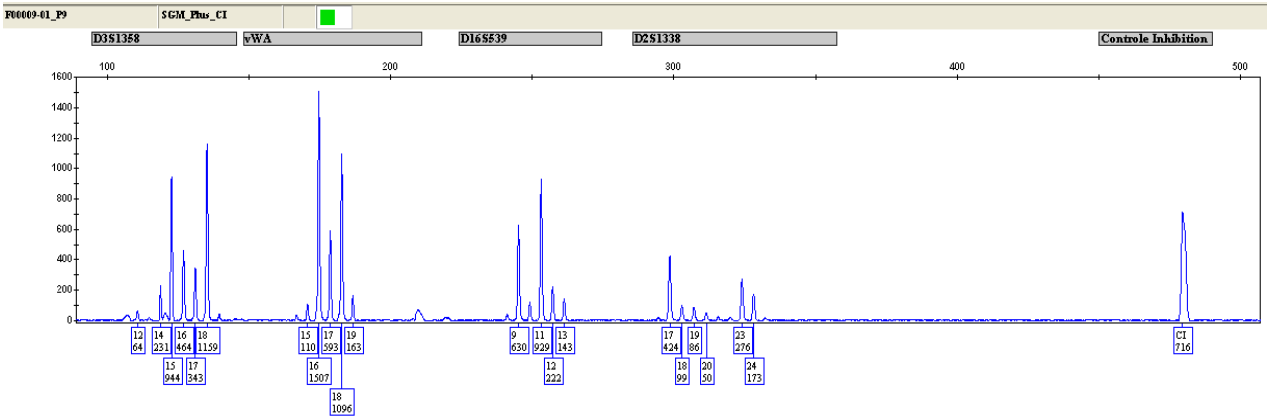
Deuxième essai :



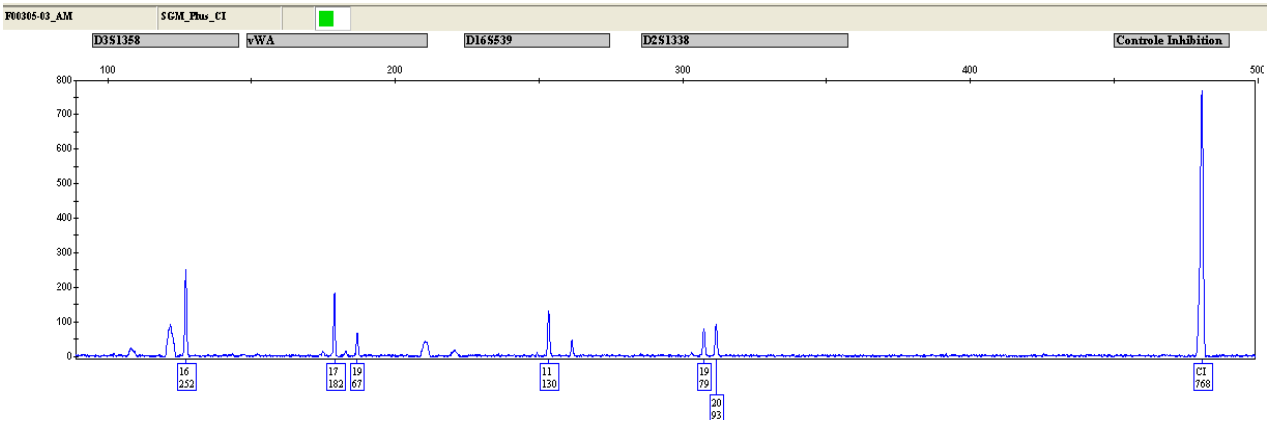
Premier essai :



Deuxième essai :



Premier essai :



Le pic du CI étant présent, il n'a pas été nécessaire de faire une deuxième amplification utilisant moins d'extrait.

6.3.9.4 Analyse des résultats

Nous pouvons dire que notre CI fonctionne comme prévu. Lorsqu'il y a de l'inhibition, le CI est absent et lorsque nous diminuons la concentration des inhibiteurs, il apparaît. Ce qui parfaitement démontré par l'extrait F0009-01, P9, dans le premier test, nous avons de l'addition A incomplète : signe d'inhibition. Dans le deuxième test, nous n'avons plus d'addition A incomplète, donc, l'inhibition est levée et le CI est présent.

Il n'y a qu'un petit détail qui nous embête, nous trouvons que notre CI est peut-être un peu trop sensible. En effet, nous craignons que le CI donne des signes d'inhibition alors que les marqueurs du kit ne sont eux pas inhibés (exemple ci-dessus, extrait F00003-04, VA), ce qui pourrait nous amener à réaliser des opérations inutiles de purification complémentaire.

7 Conclusion générale

Après tous ces tests effectués, nous pouvons conclure que notre CI joue parfaitement le rôle pour lequel il a été créé. C'est-à-dire il n'interfère pas dans le bon fonctionnement des kits, il ne réagit pas avec les réactifs des kits. Il est facilement gêné par des substances inhibitrices, ce qui fait de ce contrôle un bon indicateur d'inhibition.

En effet, ceci est bien démontré par la neuvième expérience, lorsque nous effectuons le premier test, avec 4 µl d'extrait d'échantillon, nous n'obtenons aucun pic CI. Par contre, lors de la deuxième amplification avec une quantité d'extrait plus faible, nous obtenons un meilleur profil et le pic du CI est présent. Donc, nous supposons qu'il y a bel et bien de l'inhibition.

Si cette hypothèse est vraie, notre prochain but est de vaincre cette inhibition. Nous pouvons lever cette inhibition en effectuant une purification complémentaire (nouvelle extraction) de l'extrait par exemple. Mais un des inconvénients de cette purification est que son rendement n'est pas de cent pour cent. Nous pourrions alors soit perdre de l'ADN, soit laisser encore des inhibiteurs dans notre extrait.

Alors comment connaître le rendement d'une extraction pour pouvoir vérifier si l'inhibition a bien disparu?
Une possibilité pour évaluer la performance de rendement de l'extraction est d'utiliser un deuxième contrôle de quantité connue qui nous indiquera la qualité de l'extraction. Ce contrôle sera rajouté lors de la purification. Ensuite, nous effectuons une PCR en temps réel avec une faible quantité d'extrait purifié et nous calculons le rendement.

Si le rendement est bon, nous effectuons une PCR. Puis, nous analysons les amplifiats obtenus sur l'analyseur de fragment Si l'inhibition est levée comme nous le souhaitions, nous devrions obtenir un pic plus grand que celui obtenu avec la première PCR.

8 Conclusion personnelle

Ce travail de diplôme m'a permis de me familiariser avec de nombreuses techniques en biologie moléculaire, ainsi que d'approfondir mes connaissances théoriques dans le domaine de la génétique forensique. Il est vrai que la pratique était très intéressante bien qu'elle présentait un aspect relativement répétitif.

Le problème majeur rencontré dans ce travail de diplôme a été de retrouver des échantillons présentant de l'inhibition. En effet, le laboratoire ayant déménagé et ayant récemment ouvert, il a été difficile d'obtenir beaucoup d'échantillons.

Cependant, je garde un excellent souvenir de ce travail diplôme : cette expérience m'a permise de me faire comprendre que nous ne pouvons pas tout savoir dès le départ, mais que les idées se rajoutent au fur et à mesure que nous avançons dans le travail. Et que nous ne pouvons pas effectuer le travail tout seul, mais qu'il faut un dialogue entre les différents membres de l'équipe pour améliorer les idées et pouvoir ainsi avancer.

9 Remerciements

Un grand merci à tout le personnel d'Aurigen et plus particulièrement à l'équipe de génétique médicale et de cytogénétique pour m'avoir aussi bien accueillie et soutenue tout au long de mon stage.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr. Raphaël Coquoz pour sa patience et pour son soutien théorique tout au long de ce travail de diplôme. Sans oublier Nathalie Roussy qui a fait preuve de gentillesse et de disponibilité et qui m'a beaucoup aidée.

10 Bibliographie

Ameziane N., Bogard M., Lamoril J., (2005), « *Principe de biologie moléculaire en biologie clinique* », [Livre], Paris: Elsevier Masson.

Applied Biosystems, (2007), « *AmpFlSTR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit user guide* », [Page Web] Accès : http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_support/documents/generaldocuments/cms_042748.pdf

Applied Biosystems, (2006), « *AmpFlSTR® SGM Plus™ PCR Amplification Kit user's manual* », [Page Web] Accès : http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_support/documents/generaldocuments/cms_041049.pdf

Applied Biosystems, (2006), « *AmpFlSTR® YFiler™ PCR Amplification Kit user's manual* », [Page Web] Accès : http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_support/documents/generaldocuments/cms_041477.pdf

Berthe T., (30.12.2004), « *Avantages et limites de la PCR* », [Page Web] Accès : http://www.lda22.com/dossiers/dossiers.php?id_dossier=149&idparent=148

Coquoz R., Taroni F., (2006) « *Preuve par l'ADN : la génétique au service de la justice* », [Livre], Lausanne: presses polytechniques et universitaires romandes.

Dubourg C., (2007), « *Polymerase Chain Reaction (PCR)* » [Page Web] Accès : http://www.med.univ-rennes1.fr/wkf/stock/RENNES20071031101610vdavidPCR_2007.pdf

Huckenbeck W., Scheil H.G., « *The distribution of the human DNA-PCR polymorphisms* » [Page Web] Accès : www.uni-duesseldorf.de/WWW/MedFak/Serology/database.html

Jaunin P., (2004), « *Cours de biologie moléculaire* », [Polycopié], Lausanne : ESSanté

Le Beillan L., Clevers S., (01.02.2007), « *Les empreintes génétiques en médecine légale* », [Page Web] Accès : http://www.univ-rouen.fr/ABISS/L1/WEB/empreinte/dnamolecule.html

National Center for Biotechnology Information, (04.02.2009), « *Mus musculus chromosome 4 genomic contig, strain C57BL/6J* » [Page Web] Accès : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/149252316?report=fasta&log$=seqview

Promega, (2007), « *Technical manual PowerPlex® System 16* » [Page Web] Accès : http://www.promega.com/tbs/TMD012/tmd012.pdf

Rozen S., Skaletsky H.J., (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) « *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* » Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386. Accès au logiciel : http://frodo.wi.mit.edu/

Saiki R., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T. et Erlich H.A, Arnheim N., (1985), « *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequencesand restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia* », Science, 230(4732), 1350-4.

Wautier M., (Pas de date), « *Acide désoxyribonucléique (ADN)* », [Page Web] Accès : http://w3.umh.ac.be/chimie/docs/studs03-04/MWautier/page2.htm

Référence des images:

Figure titre: http://www.nfstc.org/pdi/Subject06/images/pdi_s06.jpg

Figure [1] : http://www.univ-rouen.fr/ABISS/L1/WEB/empreinte/dnamolecule.html

Figure [2] : http://planet-terre.ens-lyon.fr/planetterre/objets/Images/fossiles-ADN/pcr.gif

Figure [3] : http://www.edu.upmc.fr/sdv/masselot_05001/polymorphisme/microsatellites.Html

Figure [4]: Coquoz, Preuve par l'ADN: la génétique au service de la justice, p.83

Figure [5] : AmpFlSTR® Yfiler™ et AmpFlSTR® Minifiler™, PCR Amplification Kit, User's manual

Figure [6] : http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/kits/PowerPlex16.htm

Figure [7] : http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/kits/SGMPlus.htm

Figure [8] : http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/kits/MiniFiler.htm

Figure [9] : http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/kits/Yfiler.htm

Figure [10] : http://www.labgene-direct.com/epages/206886.sf/fr_FR/?ObjectPath=/Shops/206886/Products/%221-1%20050%2072X%22/SubProducts/%221-1%20050%20724%22

Figure [11] : http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_041990.pdf

11 Lexique

ADN codant, c'est la portion d'ADN qui sera transcrite et ensuite traduite en protéines, et rassemble les gènes qui sont le support de l'information génétique essentielle à la vie de l'individu.

ADN non codant représente la plus grande partie du génome et on ne connaît pas aujourd'hui sa fonction précise.

Allèles sont les différentes versions d'un même gène. Chaque allèle se différencie par une ou plusieurs différences de la séquence de nucléotides. Ces différences apparaissent par mutation au cours de l'histoire de l'espèce, ou par recombinaison génétique. Tous les allèles d'un gène occupent le même locus (emplacement) sur un même chromosome.

Amorces sont des courtes séquences monocaténaires d'ADN complémentaires de régions qui flanquent l'ADN à amplifier.

Amplifiat est le mélange réactionnel de la PCR une fois que le processus d'amplification est terminé.

Electrophorèse est utilisée en biochimie ou biologie moléculaire pour la séparation des protéines ou celle des acides nucléiques. Dans un milieu donné, la séparation des particules se fait en fonction de leur charge Q et pour des Q identiques, en fonction de leur taille. La technique de l'électrophorèse est fondée sur le déplacement d'ions (molécules ayant perdu leur neutralité électrique) sous l'effet d'un champ électrique. Du fait de leurs caractéristiques propres et en fonction des conditions de l'électrophorèse ces ions auront des vitesses de migration différentes, ils vont donc se séparer les uns des autres.
Les molécules anioniques (-) migrent vers l'anode (+) et les molécules cationiques (+) se déplacent vers la cathode (-).

Fluorochrome est une substance chimique capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation. Ce sont des substances composées de plusieurs noyaux aromatiques conjugués ou encore des molécules planes et cycliques qui possèdent une ou plusieurs liaisons pi.

Génome est composé de gène défini comme un enchaînement de nucléotides, c'est-à-dire une portion d'ADN, destiné à être transcrite en ARNm et ensuite être traduite en protéine permettant ainsi de remplir les fonctions nécessaires à la vie de l'organisme et d'une autre portion d'ADN qui ne code pour rien.

Locus est une position sur l'ADN d'un chromosome.

Mini-satellites ou **VNTR** (Variable Numbers of Tandem Repeats) correspondent à des séquences répétées en tandem, appelées « cores », de 10 à 40 paires de bases. Le nombre de ces répétitions est variable d'un individu à l'autre, constituant une série d'allèles. Ces allèles se transmettent selon le mode mendélien : l'enfant reçoit un allèle de son père et un allèle de sa mère.

Micro-satellites ou **STR** (Short Tandem Repeats), unités répétitives dont le « core » est très court (4 paires de bases en moyenne) et répété de deux à dix fois au plus. Des centaines de micro-satellites ont été étudiés mais, pour la pratique des empreintes génétiques on ne retient que ceux qui sont aisément amplifiables, avec une expression simple des allèles et présentant un fort taux d'hétérozygotie.

Multiplex est une PCR destinée à amplifier plus d'un amplicon à la fois, par l'utilisation d'au moins trois amorces par réaction de PCR. Les produits de PCR ne sont alors compétitifs que pour la polymérase, les dNTP et, éventuellement, le marqueur d'ADN.

Polymorphisme concerne n'importe quelle différence entre les individus. On peut l'observer au niveau de l'aspect général des individus, au niveau des protéines. Caractère ou gène pour lequel il existe plusieurs variantes au sein d'une population.

Profil d'ADN ou profil génétique est une portion d'ADN spécifique à chaque individu.

Standard interne est un mélange de plusieurs fragments d'ADN dont les tailles sont connues.

Stutter littéralement en français « bégaiement ». Les stutters sont des produits secondaires qui apparaissent sur les profils ADN sous la forme d'un pic de taille réduite correspondant à un allèle ayant un élément répétitif de moins que l'allèle dominant. Ces stutters se forment pendant la phase d'élongation de la PCR. C'est comme si la Taq polymérase patine et omet parfois un élément répétitif, produisant donc un produit raccourci d'un élément. Le phénomène des stutters est d'autant plus prononcé que l'élément répétitif est court.

Taq polymérase est une enzyme, plus particulièrement une ADN polymérase qui agit dans une certaine gamme de température. Elle a été isolée à partir de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* en 1965. Elle est dépourvue d'activité exonucléasique ce qui rend donc impossible la correction d'erreur lors de copie.

12 Annexes

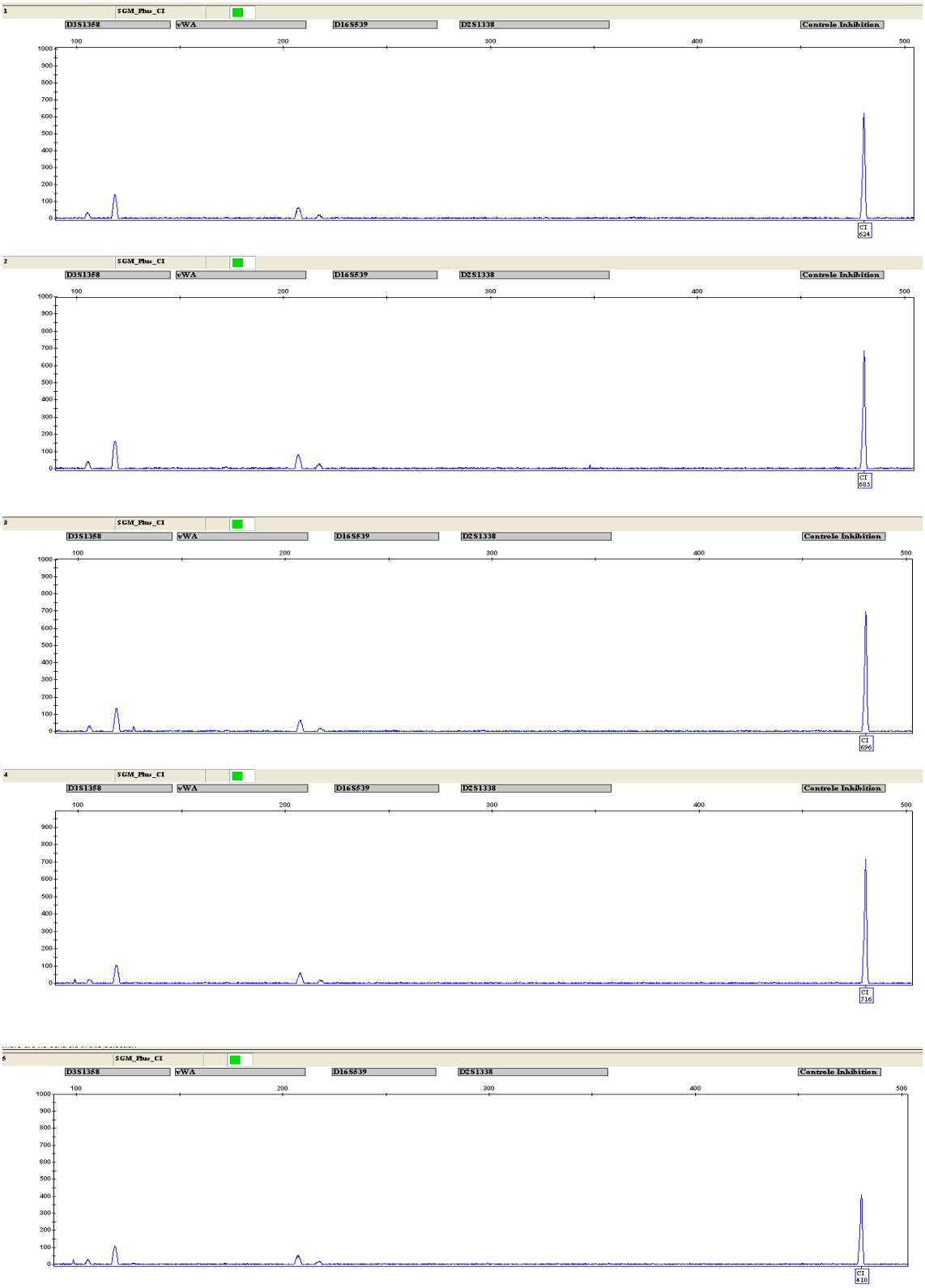
Annexe 1:

Nucléotides :

10155061 aactgtccag cgcatgggtg ctgggactga gagaagagag atttggtgac cccgttactg
10155121 attgctacct aatgcctgag ctccctggtg gaaaatacct ggagctgtaa taatcttcag
10155181 ggttagctta ggggaggggc tagactgaag gctgacaaag ggcctcccag atcacctctg
10155241 tcttcttctt gtcaggggct cccacgggat taaagactgg agccacctgt gaccactggc
10155301 agctccacgc ccactactac ccccacttc tgcgatccgc aactgtccgg aagttcatgg
10155361 ttggctatga aatgcttgcc caggcccagc gtgacctcac tcccgaacag gtcaggactc
10155421 acatcctggg tcgtcatatc cgttcacctc atttcctcac gggatctcag cagtcttgac
10155481 cctgaagagc ctcataaaaa tctctgcatt cctagaactc agtcgccact caactccacc
10155541 ccctggtgac tccagctatc ctgaactaat cttcccatcc cataagccct cctcagtatt
10155601 tcctgggccc agaacgcctc ggtacaattc caggtgaccc ttactctccc tgattgcttc
10155661 ttgtcccttt ataggccgca gaaagattaa gggcgcttcc cgaggtacac tattgcctgg
10155721 cgcagaaaga caaggaaacg gcagccattg cttgactgtg accacatcag ggccttgaat
10155781 ctttgtacct gacagacctg ggacctggag ttcgggcaga tgtgacatca ataaaactgc
10155841 gtctcacatt ttaaccatgt tttctgacac cagaggagta gtgtggactc ttacattccg
10155901 gagtttgggt aaaggctaag tgtgactcca aacactcttg cctacggact ttgaaaaatt
10155961 tggtgcaaga atccccttca ccaagccaga catgatggtg tgtgcctgtg attccaccac
10156021 attggcagct gcattaggat tgcgaatttg aggccagtgt gggttactta gcaagaccta
10156081 gtctctgaaa ccgaagccat gctggatctc atgttacagg tctgtaatcc tggctcccca
10156141 ggacactgag gcaggaggat tgcaaattca aggctagtca gggtagcttg gtgagactgt
10156201 ctggtacaaa ggacctgtga aataggtcag tggtagagtg ggtgtctgac acatgtaagg
10156261 ccctgtgttc agccctaact atagagaaga aaatcctacc tctgctcaat gttcactatt
10156321 gtctccaatc ctcttcactt gtgatatgga tagcatgcta atttaggagg ctgtttaaaa

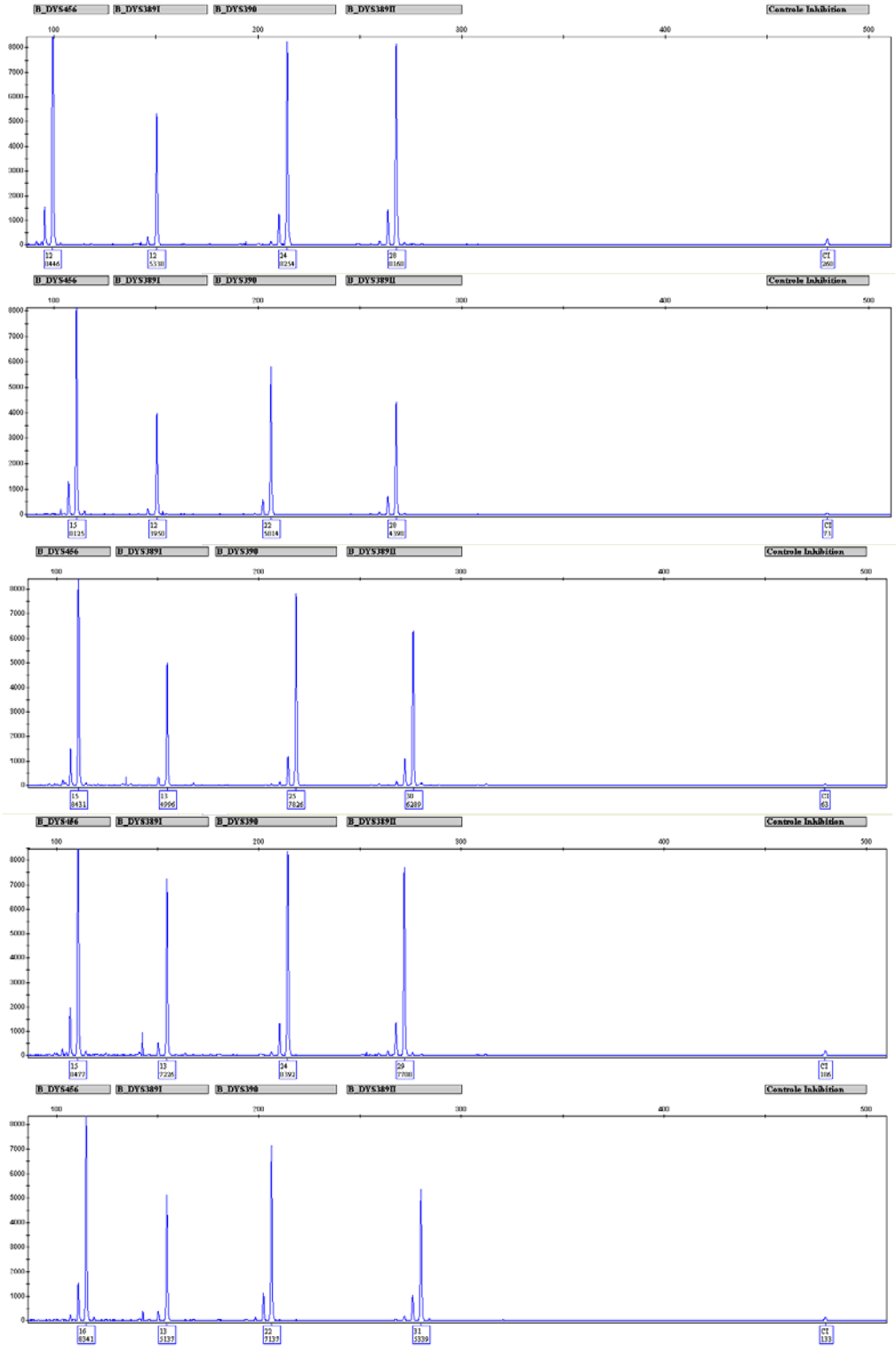
GALT-F / amorce trouvée = GALT-R2
GALT-R / 2ème amorce trouvée = GALT-F2

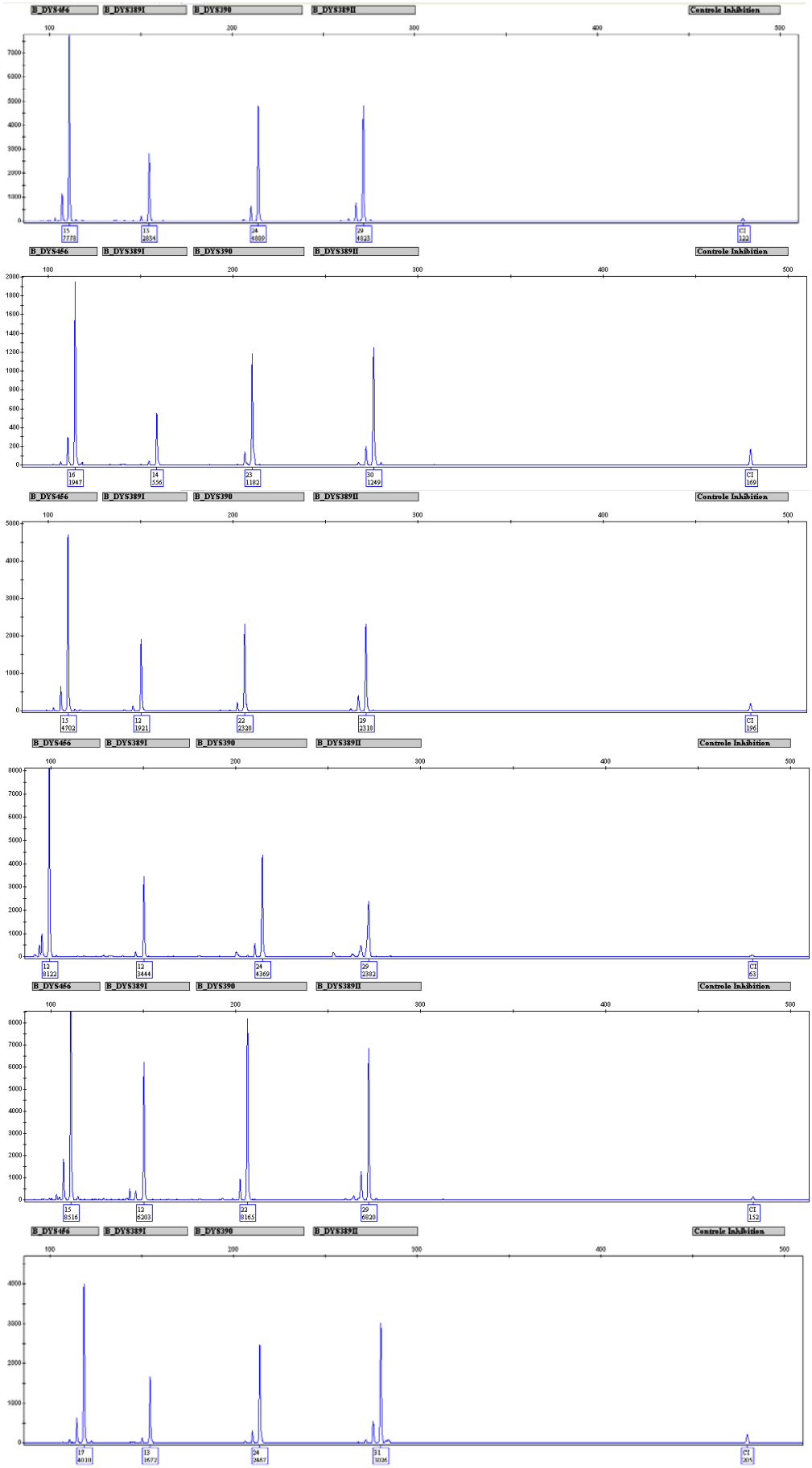
Annexe 2:

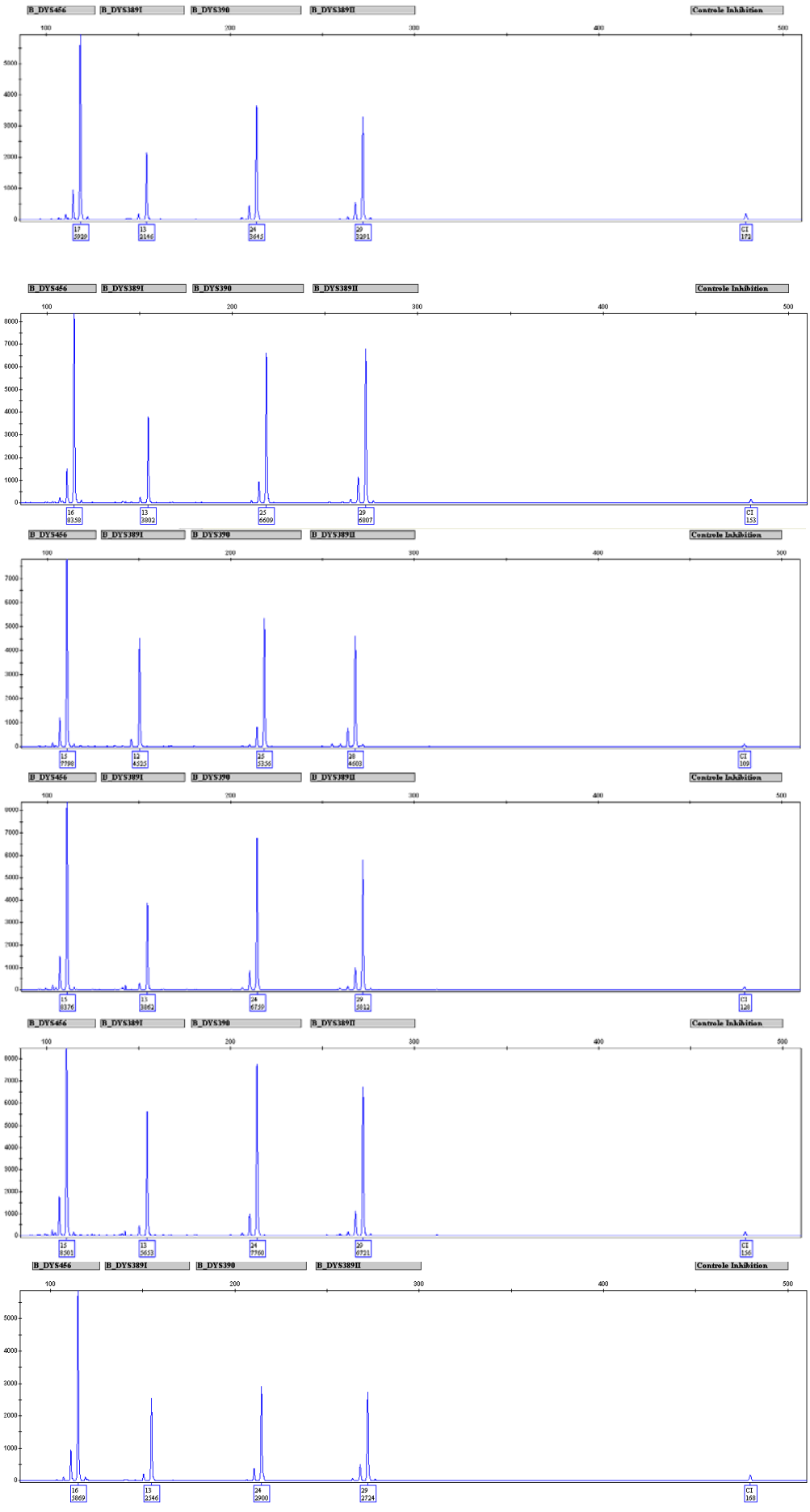

SGM_Plus_CI
D3S1358
vWA
D16S539
D2S1338
Controle Inhibition
CI 624
CI 683
CI 696
CI 716
CI 410

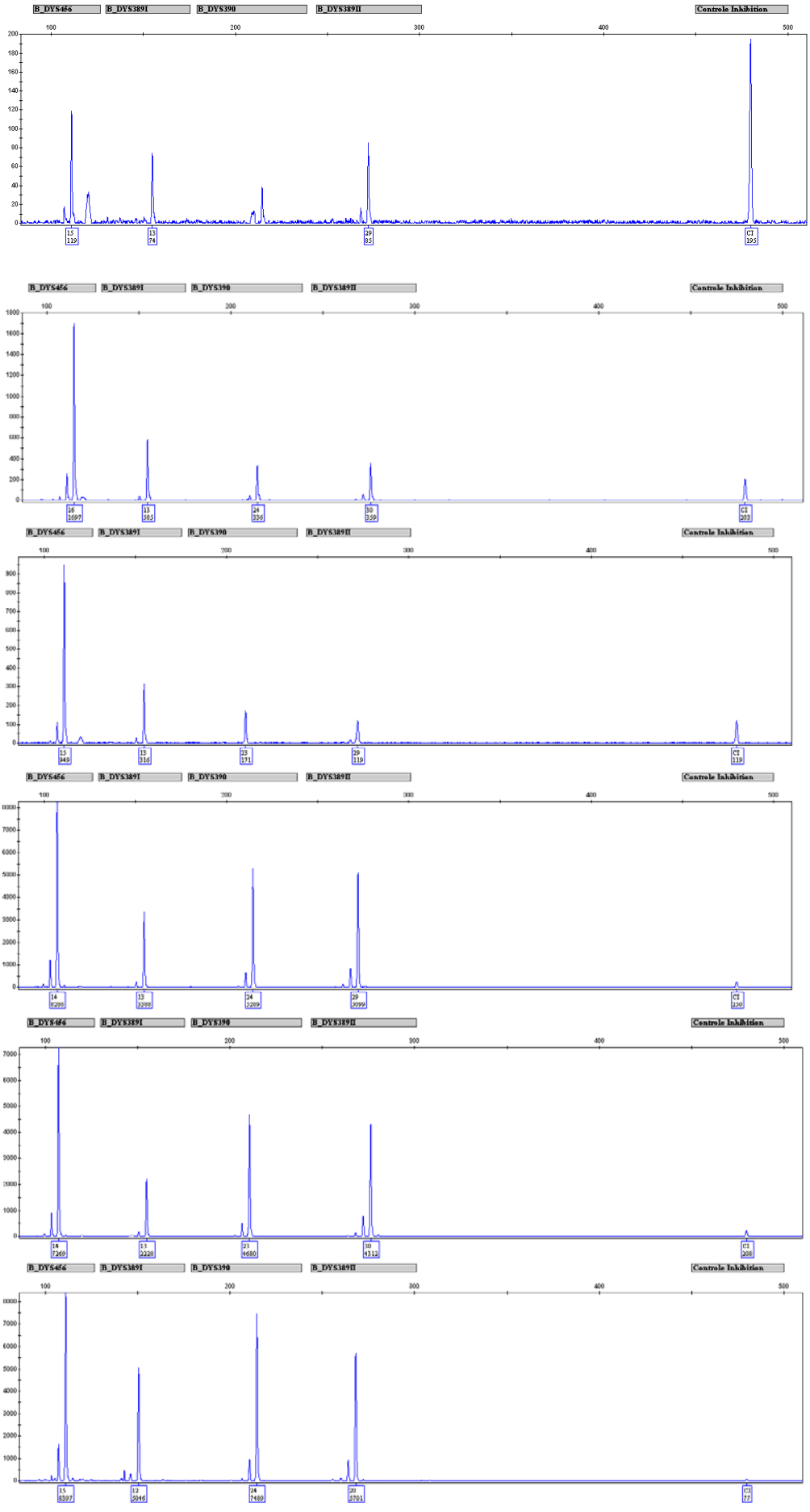
Annexe 3:

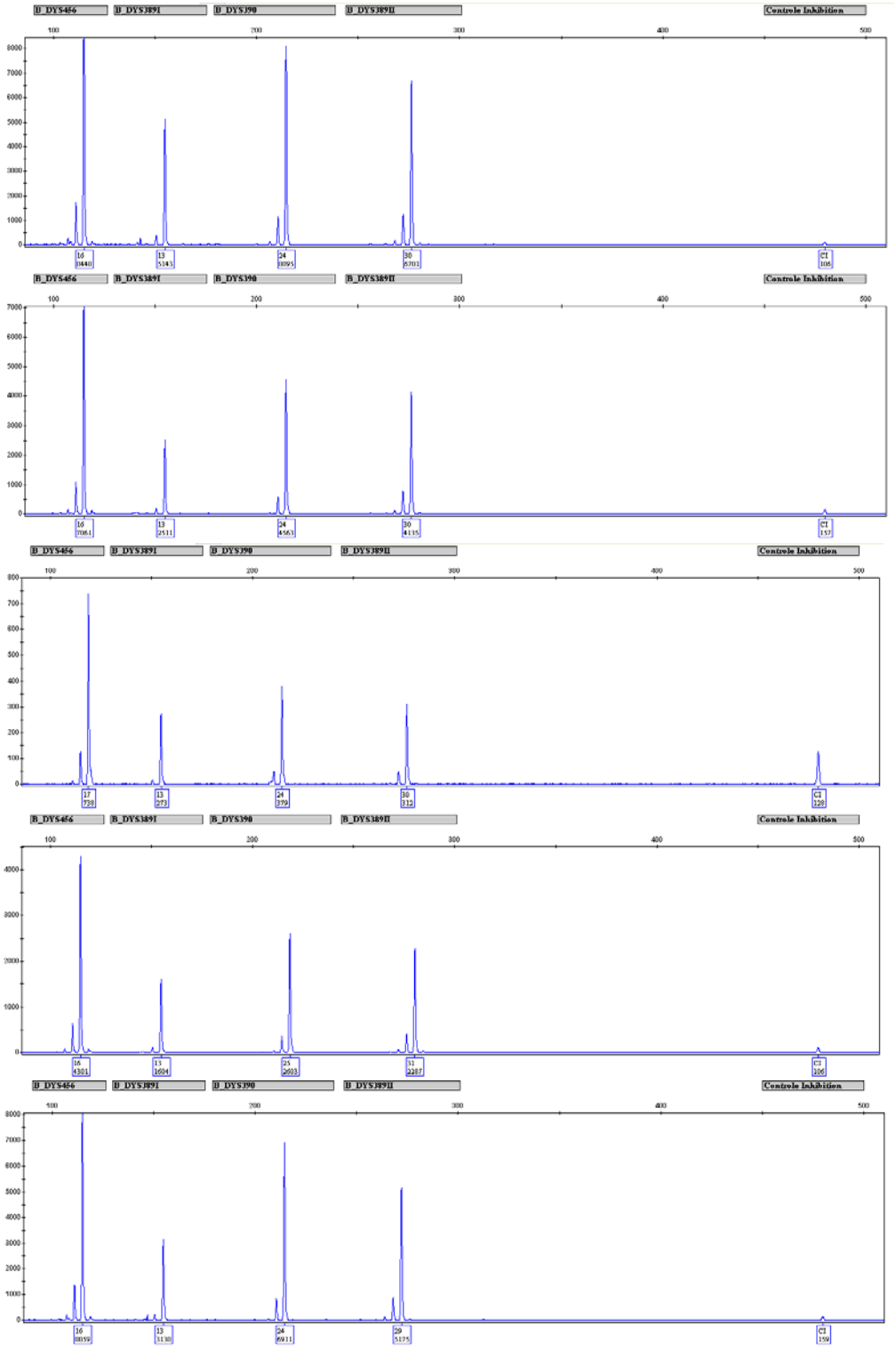
Première technicienne:

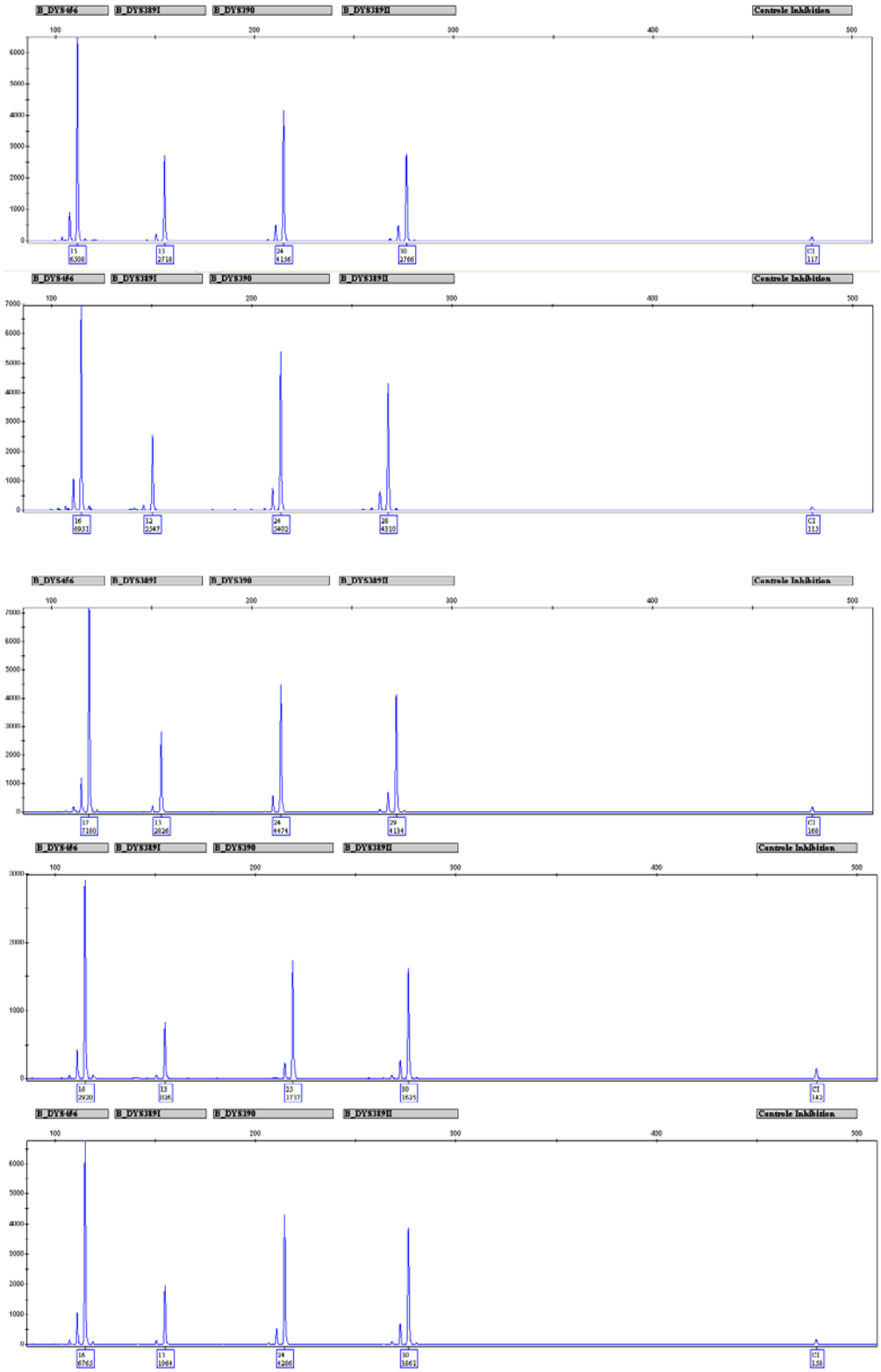



B_DYS456
B_DYS3891
B_DYS390
B_DYS389II
Controle Inhibition

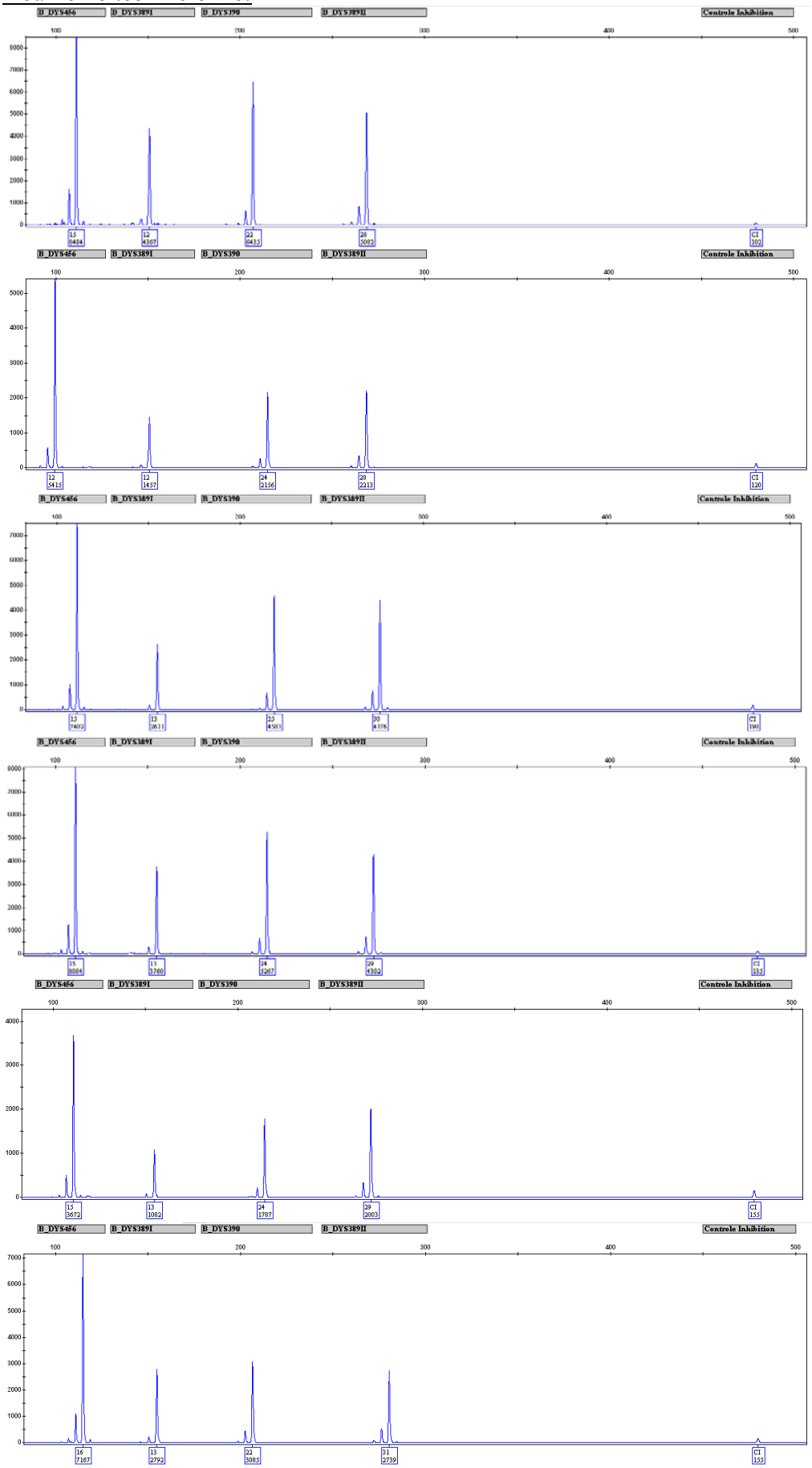

B_DYS456
B_DYS389I
B_DYS390
B_DYS389II
Controle Inhibition

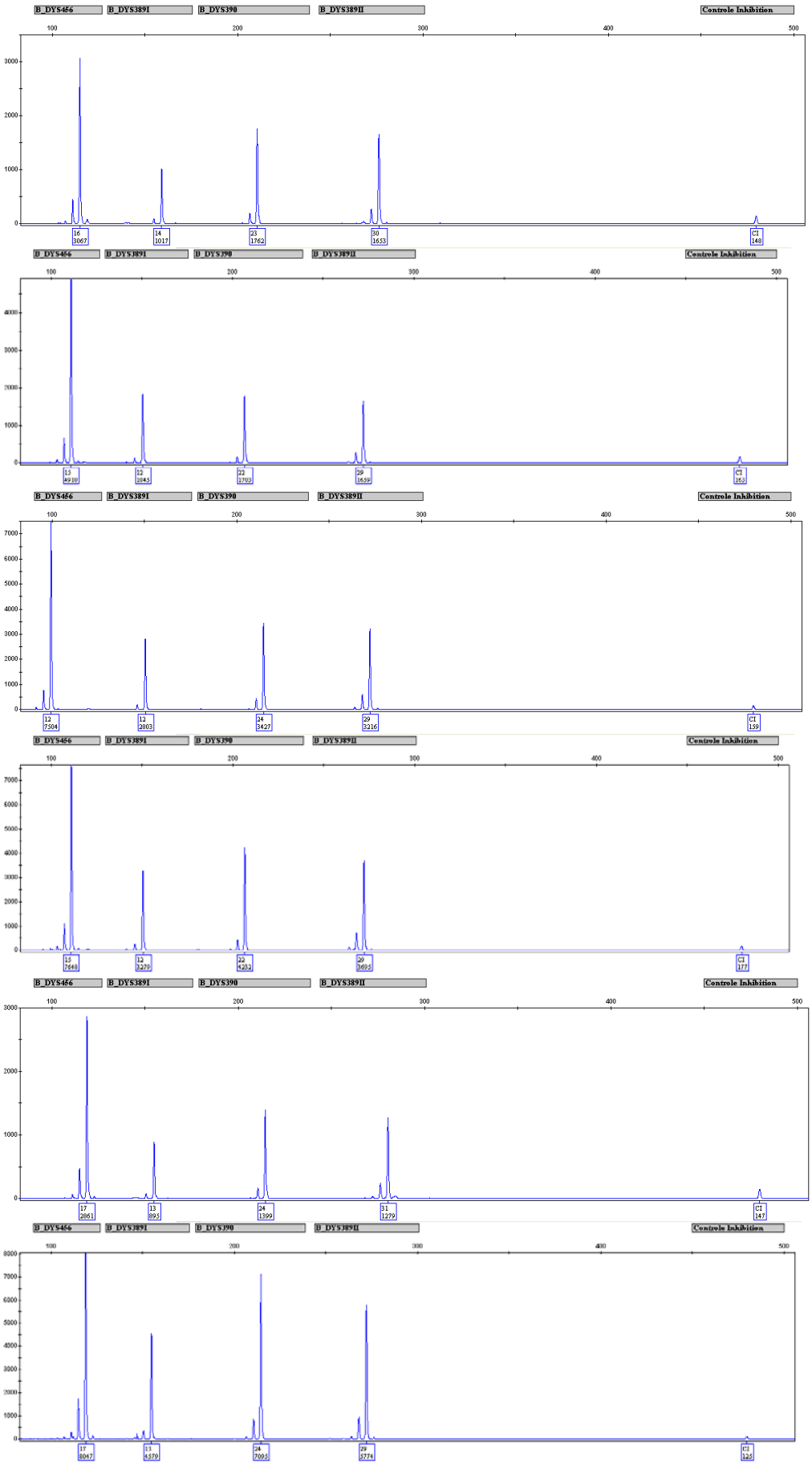

B_DYS456
B_DYS389I
B_DYS390
B_DYS389II
Controle Inhibition

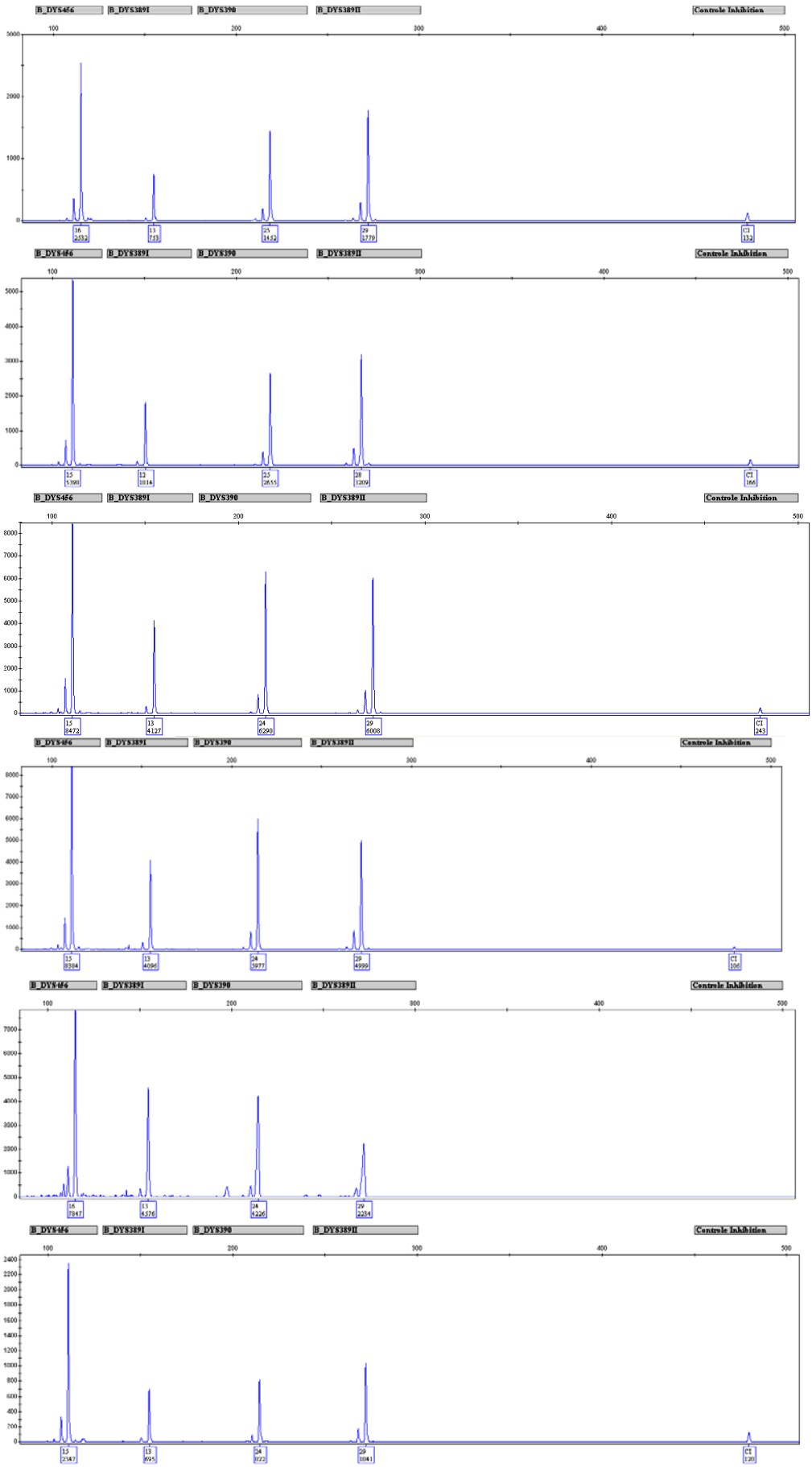

B_DYS456
B_DYS389I
B_DYS390
B_DYS389II
Controle Inhibition

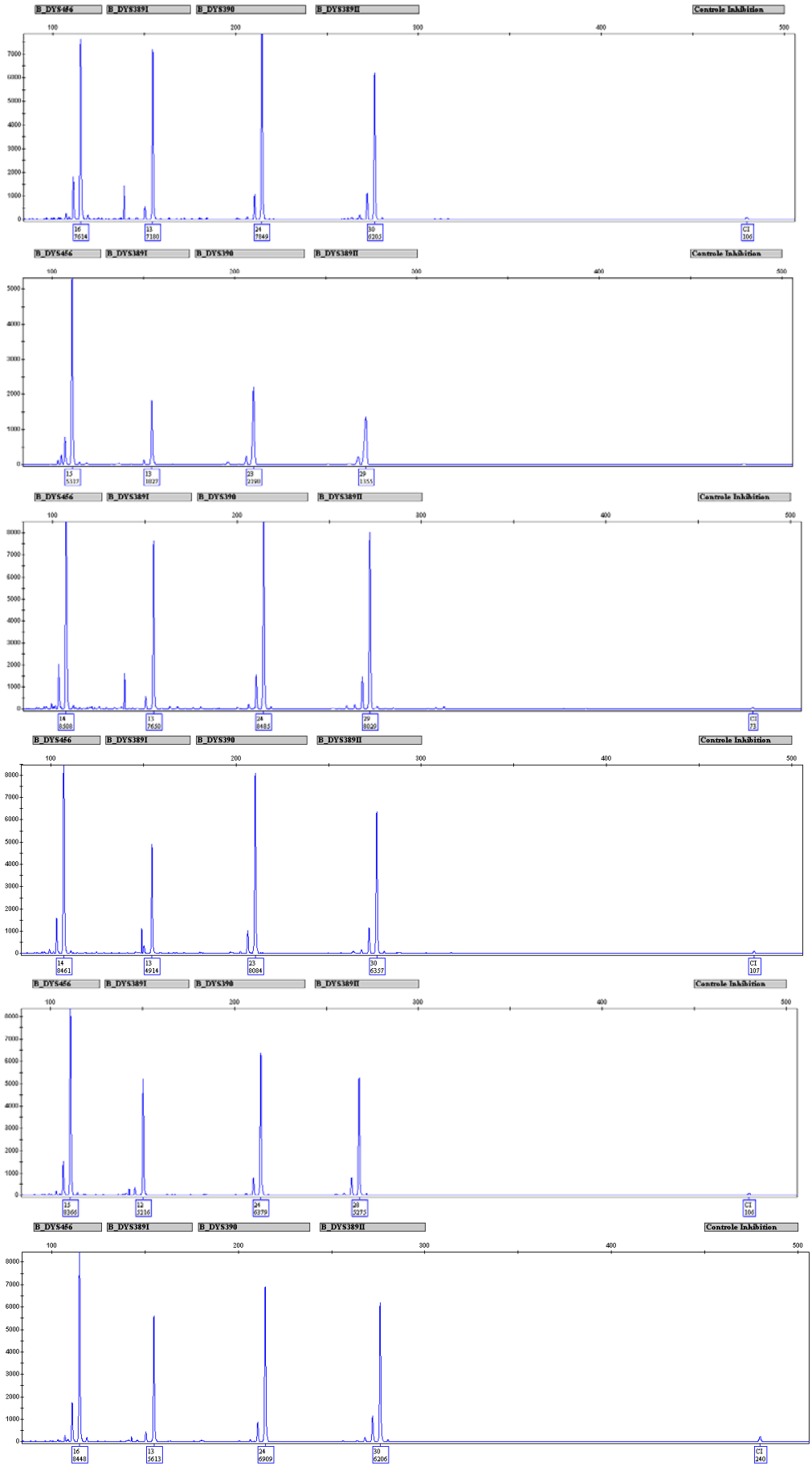

B_DYS456
B_DYS389I
B_DYS390
B_DYS389II
Controle Inhibition

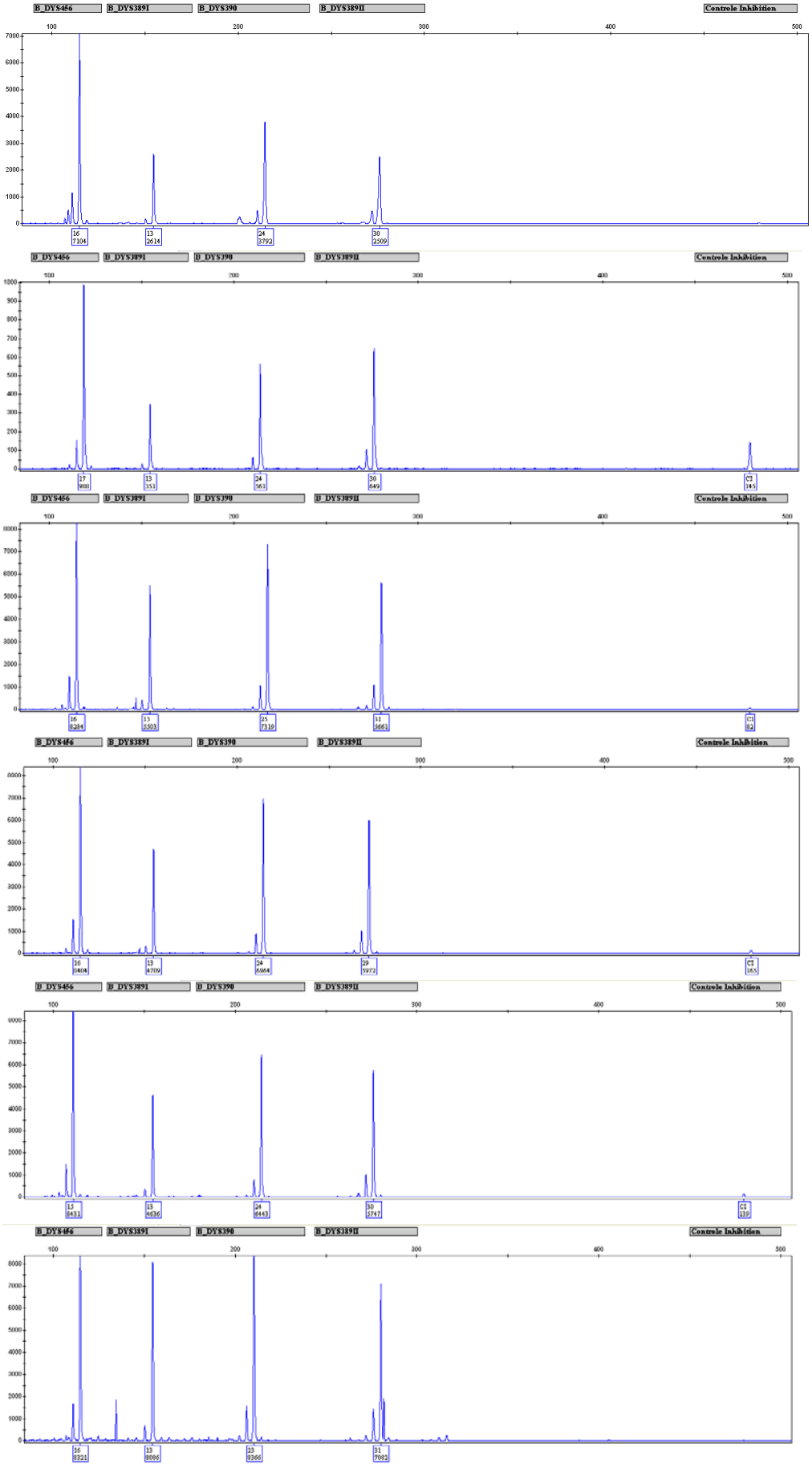
Deuxième technicienne:

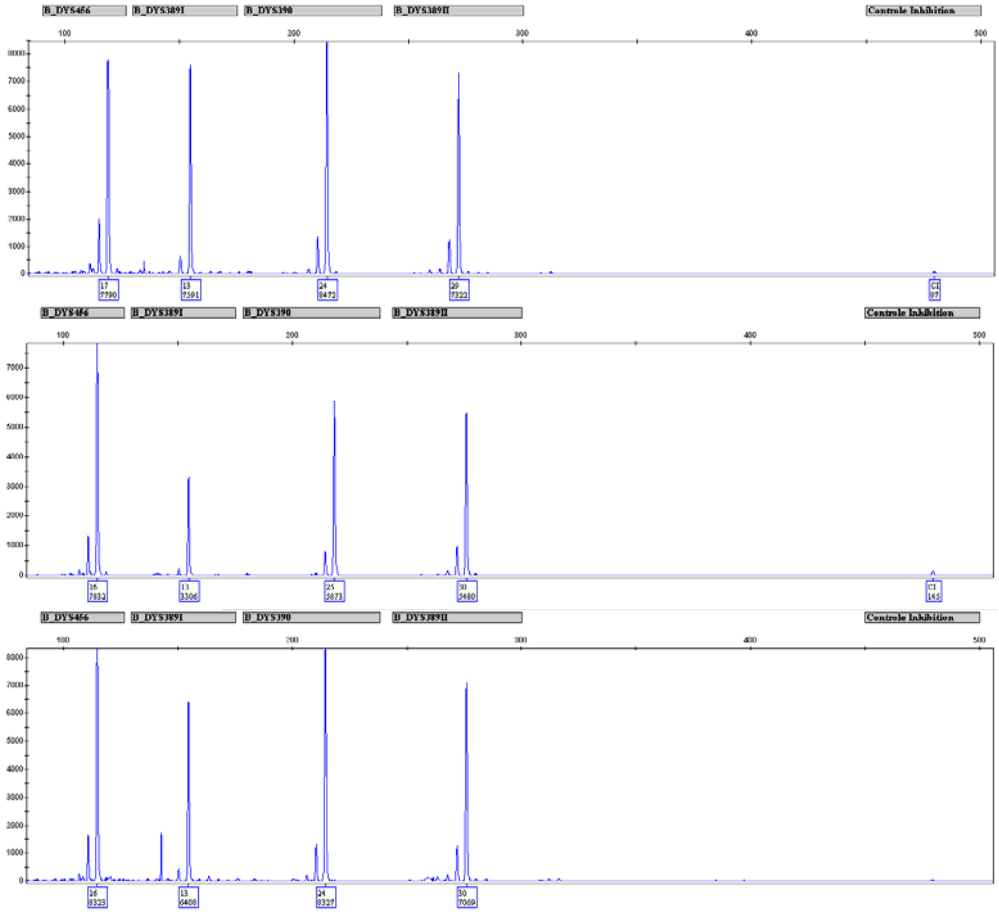



B_DYS456
B_DYS389I
B_DYS390
B_DYS389II
Controle Inhibition


B_DYS456
B_DYS389I
B_DYS390
B_DYS389II
Controle Inhibition


B_DYS456
B_DYS3891
B_DYS390
B_DYS389II
Controle Inhibition


B_DYS456
B_DYS3891
B_DYS390
B_DYS3891I
Controle Inhibition


B_DYS456
B_DYS389I
B_DYS390
B_DYS389II
Controle Inhibition
17 7790
13 7591
24 8472
29 7222
CI 97
B_DYS456
B_DYS389I
B_DYS390
B_DYS389II
Controle Inhibition
16 7832
13 3306
25 5873
30 5480
CI 145
D_DYS456
D_DYS389I
D_DYS390
D_DYS389II
Controle Inhibition
16 8323
13 6408
24 8327
30 7069